



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y
BIOLOGÍA CELULAR
ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR

**PAPEL DEL GEN *ADCK2* EN LA REGULACIÓN
DE LA SÍNTESIS DE COENZIMA Q. DE LO
CLÍNICO A LO MOLECULAR.**

Luis Vázquez Fonseca

Sevilla, 2013



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA Y
BIOLOGÍA CELULAR
ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR

**PAPEL DEL GEN *ADCK2* EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE
COENZIMA Q. DE LO CLÍNICO A LO MOLECULAR.**

Memoria de tesis presentada por **Luis Vázquez Fonseca**, Licenciado
en Bioquímica para optar al grado de **DOCTOR**.

Los Directores

CARLOS SANTOS OCAÑA
Profesor Titular Biología Celular

PLÁCIDO NAVAS LLORET
Catedrático de Biología Celular

Sevilla, a 10 de Mayo de 2013



D. CARLOS SANTOS OCAÑA, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y PROFESOR TITULAR DE BIOLOGÍA CELULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMA

Que **Don Luis Vázquez Fonseca**, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Papel del gen *ADCK2* en la regulación de la síntesis de coenzima Q. De lo clínico a lo molecular.**”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 10 de Mayo de dos mil trece.



D. PLÁCIDO NAVAS LLORET, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y CATEDRÁTICO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMA

Que **Don Luis Vázquez Fonseca**, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Papel del gen *ADCK2* en la regulación de la síntesis de coenzima Q. De lo clínico a lo molecular.**”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 10 de Mayo de dos mil trece.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo el programa de doctorado de Biotecnología y Tecnología Química en el grupo de investigación del CIBERER U729 en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Área de Biología Celular del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide y bajo la dirección del Dr. Carlos Santos Ocaña y el Dr. Plácido Navas Lloret gracias a la financiación de los proyectos de investigación del FIS del ISCIII P111/00078 y PI080500. El trabajo del doctorando ha sido financiado por una beca predoctoral PFIS del ISCIII.

ÍNDICE

<u>SUMMARY/RESUMEN</u>	9
<u>INTRODUCCIÓN</u>	17
1. LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	18
1.1. Las enfermedades mitocondriales son causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial y el ADN nuclear	18
1.2. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades mitocondriales.....	21
2. EL COENZIMA Q Y SU IMPLICACIÓN EN LA PATOLOGÍA MITOCONDRIAL	24
2.1. Estructura y funciones del coenzima Q	24
2.2 Biosíntesis del coenzima Q en eucariotas.....	28
2.2.1 Regulación de la biosíntesis del coenzima Q en eucariotas	32
2.3. El síndrome de deficiencia de coenzima Q.....	34
2.3.1. Tratamiento del síndrome de deficiencia de coenzima Q.....	36
3. EL GEN <i>ADCK2</i>, SU POSIBLE RELACIÓN CON EL COENZIMA Q Y LA PATOLOGÍA	38
3.1. <i>ADCK2</i> pertenece a la familia de quinasas atípicas ABC1	38
3.2. Generalidades del miembro <i>ADCK2</i>	41
3.3 Pacientes con mutaciones en el gen <i>ADCK2</i>	42
3.3.1. Determinación de la mutación en <i>ADCK2</i>	43
3.3.2. Historial familiar de los pacientes con mutaciones en <i>ADCK2</i>	45
3.3.2. Cuadro clínico de los pacientes con mutaciones en <i>ADCK2</i>	46
3.3.2. Tratamiento de los pacientes con mutaciones en <i>ADCK2</i>	50
<u>OBJETIVOS</u>	52
<u>RESULTADOS</u>	54
1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>ADCK2</i>	55
1.1. Contenido de CoQ ₁₀ en fibroblastos	57
1.2. Tasa de síntesis de CoQ ₁₀ por incorporación de [¹⁴ C]pHB	59
1.3. Determinación de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria	61
1.4. Determinación de la β-oxidación de los ácidos grasos	63
1.5. Determinación de los niveles de L-Lactato en el medio de cultivo celular.....	69
1.6. Determinación de la autofagia y la mitofagia.....	71

1.7. Niveles de ARNm de ADCK2 y genes de la ruta de síntesis del CoQ ₁₀	74
2. IMPLICACIÓN DEL GEN ADCK2 EN LA SÍNTESIS DE COENZIMA Q	79
2.1. Complementación de ADCK2 en levaduras mutantes nulas en el gen ortólogo YPL109c.....	80
2.1.1. Relación del gen ADCK2 humano con el gen YPL109c.....	80
2.1.2. Contenido de coenzima Q mitocondrial.....	81
2.1.3. Crecimiento en medios con fuentes de carbono fermentables y no fermentables.....	84
2.1.4. Determinación de actividades de la cadena respiratoria	87
2.1.5. Determinación de la β -oxidación	91
2.2. Silenciamiento y sobreexpresión transitoria de ADCK2 en células MRC5.....	92
2.2.1. Contenido de coenzima Q	92
2.2.2. Tasa de síntesis de CoQ ₁₀ por incorporación de [¹⁴ C]pHB	93
2.2.3. Determinación de la β -oxidación	96
2.2.4. Niveles de ARNm de los genes de la ruta de síntesis del CoQ ₁₀	98
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ADCK2	101
3.1 Expresión espacio-temporal de ADCK2 en <i>Mus musculus</i>	101
3.1.1 Expresión temporal de ADCK2 durante el desarrollo de <i>Mus musculus</i>	101
3.1.2 Expresión espacial de ADCK2 en <i>Mus musculus</i>	103
3.3 Localización de la proteína ADCK2	105
3.3.1. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	105
3.3.2 Subfraccionamiento celular y mitocondrial	106
3.4 Función bioquímica de ADCK2	112
3.4.1 Actividad quinasa de ADCK2	112
3.4.2 Función pseudoquinasa de ADCK2	116
4. APROXIMACIÓN TERAPEÚTICA DE LA DEFICIENCIA DE CoQ₁₀ MEDIANTE LA TRANSDUCCIÓN CON PARTÍCULAS LENTIVÍRICAS	122
5. DISCUSIÓN FINAL	126
<u>CONCLUSIONS/CONCLUSIONES</u>	131
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	134
1. MÉTODOS GENERALES DE BACTERIAS	135
1.1. Estirpes, medios y cultivo	135
1.2. Medida del crecimiento en cultivo	135
1.3. Transformación con ADN plasmídico	135
2. MÉTODOS GENERALES DE LEVADURAS	136
2.1. Estirpes, medios y cultivo	136

2.2. Medida del crecimiento en cultivo	137
2.3. Transformación con ADN plasmídico	137
2.4. Ensayo de crecimiento de cultivos en <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	138
2.5. Ensayo de viabilidad en placas en <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	138
3. MÉTODOS GENERALES DE RATONES	138
3.1. Cepa, y condiciones de mantenimiento	138
4. MÉTODOS GENERALES DE CULTIVOS CELULARES	139
4.1. Tipos celulares, medios y cultivo	139
4.2. Medida del crecimiento del cultivo y de la viabilidad celular.....	140
4.3. Transformación con ADN exógeno	140
4.3.1. Generación de silenciamiento transitorio de <i>ADCK2</i> mediante siRNA en líneas celulares	140
4.3.2. Generación de sobreexpresión transitoria de <i>ADCK2</i> mediante ADN plasmídico en líneas celulares	142
4.3.3. Generación de sobreexpresión estable de <i>ADCK2</i> mediante el uso de partículas lentivíricas en fibroblastos	142
4.3.3.1. Empaquetamiento de partículas lentivíricas mediante cotransfección de vectores de empaquetado en células 293T	142
4.3.3.2. Obtención de líneas estables mediante transducción de las partículas lentivíricas.....	143
5. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR	144
5.1. Diseño de cebadores y cebadores usados.....	144
5.2. Clonajes en distintos vectores	144
5.3. Amplificación y clonación de <i>ADCK2</i> en distintos vectores	144
5.4. Amplificación y clonación de <i>YPL109c</i> en distintos vectores	146
5.5. Clonación de <i>ADCK2</i> con el promotor, MTS y terminador de <i>YPL109c</i> mediante PCR recombinante	146
5.6. Generación de las estirpes con las mutaciones de los pacientes <i>ADCK2</i> -P1, P2 y P3 mediante mutagénesis dirigida	148
5.7. Análisis de los transformantes mediante PCR y corte con enzimas de restricción	149
5.8. Secuenciación de los clonajes.....	149
5.9. Purificación de ADNg de levadura	150
5.10. Determinación de los niveles de ARNm mediante RT-PCR.....	150
5.10.1. Extracción del ARN	150
5.10.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN	151
5.10.3. Medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real.....	152
5.10.4. Cuantificación de ARN/ADN	152
6. MÉTODOS BIOQUÍMICOS	153

6.1. Cuantificación de proteínas	153
6.2. Extracción de proteínas a partir de células	153
6.3. Resolución de muestras de proteínas en SDS-PAGE y visualización mediante tinción de plata y tinción con Azul de Coomassie	153
6.4. Inmunotinción de geles de acrilamida.....	154
6.5. Purificación de la proteína recombinante <i>ADCK2</i> en bacterias mediante cromatografía de afinidad.....	155
6.6. Validación de la purificación de <i>ADCK2</i> recombinante mediante espectrometría de masas y determinación de su concentración	156
6.7. Ensayo de la función quinasa “ <i>in vitro</i> ”	156
6.8. Métodos de subfraccionamiento celular.....	157
6.8.1. Purificación de mitocondrias en levaduras	157
6.8.2. Subfraccionamiento celular y purificación de mitocondrias en células humanas.....	157
6.8.3. Subfraccionamiento celular y purificación de MAMs en hígado de ratón	158
6.8.4. Determinación de la localización submitocondrial mediante ensayo con proteínasa K.....	158
6.9. Cuantificación de compuestos quinónicos a partir de muestras complejas	159
6.9.1. Síntesis de pHB radiomarcado.....	159
6.9.2. Cuantificación de la tasa de síntesis de CoQ ₁₀ a partir de pHB radiomarcado.....	160
6.9.3. Extracción de compuestos quinónicos a partir de muestras complejas	160
6.9.4. Cuantificación de los compuestos quinónicos en muestras complejas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC)	160
6.10. Determinación de la actividad del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos.....	161
6.11. Determinación de los niveles de L-lactato en medio de cultivo de células	162
6.12. Localización subcelular de <i>ADCK2</i> mediante inmunofluorescencia	162
6.13. Determinación de las actividades de la cadena de transporte electrónico mitocondrial	163
6.13.1. Actividad del complejo I (NADH-DCIP reductasa)	164
6.13.3. Actividad del complejo III (decilubiquinona-citocromo c reductasa)	164
6.13.4. Actividad del complejo I+III (NADH-citocromo c reductasa)	164
6.14. Determinación de la autofagia y mitofagia en cultivos celulares.....	164
7. CÁLCULOS ESTADÍSTICOS.....	165
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	172

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema del ADNmt con algunas de las mutaciones que provocan la aparición de algunos síndromes.....	20
Figura 2. Ciclo de oxido-reducción del coenzima Q	25
Figura 3. Cadena de transporte electrónico mitocondrial	26
Figura 4. Biosíntesis de los precursores del coenzima Q	29
Figura 5. Ruta de biosíntesis del coenzima Q propuesta en eucariotas.....	31
Figura 6. Mapa filogenético del quinoma humano	39
Figura 7. Localización del gen <i>ADCK2</i> en el ADNn	42
Figura 8. Determinación de la mutación en <i>ADCK2</i> en la familia de origen alemán	44
Figura 9. Pedigrí de las familias con mutaciones en <i>ADCK2</i>	46
Figura 10. Transporte a la mitocondria y degradación en el ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos	48
Figura 11. Histología muscular del paciente <i>ADCK2</i> -P2	49
Figura 12. Perfil de acil-carnitinas en sangre encontrados en <i>ADCK2</i> -P2 tras someterse al tratamiento con riboflavina	51
Figura 13. Contenido de CoQ ₁₀ en los fibroblastos de pacientes	57
Figura 14. Medida de la tasa de síntesis de CoQ ₁₀ a partir de su precursor [¹⁴ C]pHB.....	59
Figura 15. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	62
Figura 16. Relación entre la cadena de transporte de electrones y el ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria	64
Figura 17. Medida del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos	65
Figura 18. Contenido de CoQ ₁₀ en fibroblastos de pacientes con mutaciones en enzimas de la β -oxidación	66
Figura 19. Concentración de lactato en el medio de cultivo estandarizado por célula	70
Figura 20. Determinación de la autofagia y la mitofagia	72
Figura 21. Expresión relativa del gen <i>ADCK2</i>	75
Figura 22. Cantidad de la proteína <i>ADCK2</i>	75
Figura 23. Expresión de los genes <i>COQ</i>	77
Figura 24. Matriz de puntos dotplot comparando las secuencias de las proteínas <i>ADCK2</i> e YPL109c	80
Figura 25. Determinación de la cantidad de CoQ ₆ en las estirpes generadas en la complementación de <i>ADCK2</i> en levadura	82
Figura 26. Crecimiento de las estirpes de levadura en un medio con glucosa como fuente de carbono (YPD)	85
Figura 27. Crecimiento de las estirpes de levadura en un medio con glicerol como fuente de carbono (YPG).....	86

Figura 28. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria en las estirpes generadas para la complementación	88
Figura 29. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria en estirpes con todas las versiones de YPL109c sobre fondo silvestre utilizadas en la complementación	89
Figura 30. Medida del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos	91
Figura 31. Contenido de CoQ ₁₀ en células de la línea MRC5 donde se ha silenciado o sobreexpresado transitoriamente <i>ADCK2</i>	92
Figura 32. Tasa de síntesis de CoQ ₁₀ a partir de [¹⁴ C]pHB en células MRC5 tras sobreexpresar <i>ADCK2</i>	93
Figura 33. Tasa de síntesis de CoQ ₁₀ a partir de [¹⁴ C]pHB en células MRC5 tras silenciar <i>ADCK2</i>	94
Figura 34. Medida del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos en células MRC5 tras silenciar y sobreexpresar <i>ADCK2</i>	97
Figura 35. Expresión de los genes <i>COQ</i> y <i>PPTC7</i> tras silenciar y sobreexpresar transitoriamente <i>ADCK2</i> en células MRC5.....	99
Figura 36. Expresión relativa de <i>ADCK2</i> durante el desarrollo embrionario en el ratón	102
Figura 37. Expresión relativa de <i>ADCK2</i> en tejidos de ratón	103
Figura 38. Localización de <i>ADCK2</i> -EGFP por sobreexpresión en el vector pEGFP-N1 en células HEK293 mediante microscopía confocal	106
Figura 39. Localización celular y mitocondrial de <i>ADCK2</i>	108
Figura 40. Cuantificación de la proteína recombinante <i>ADCK2</i> -GST a partir de cantidades conocidas de proteína BSA	113
Figura 41. Detección en la fracción purificada de la proteína recombinante <i>ADCK2</i> -GST mediante inmunotinción	113
Figura 42. Ensayo quinasa de la proteína recombinante <i>ADCK2</i> -GST.....	114
Figura 43. Estudio de la secuencia de los dominios (pseudo)quinasa en la familia ABC1 y la proteína YPL109c.....	119
Figura 44. Ensayo quinasa de PKC y CDK en presencia de distintas cantidades de <i>ADCK</i> -GST	120
Figura 45. Fibroblastos <i>ADCK2</i> -P3 expresando GFP	122
Figura 46. Determinación de la expresión de <i>ADCK2</i> en <i>ADCK2</i> -P3/pRRL- <i>ADCK2</i>	123
Figura 47. Determinación de CoQ ₁₀ en fibroblastos <i>ADCK2</i> -P3 tras la transducción con partículas lentivíricas	124
Figura 48. Modelo del papel de <i>ADCK2</i> en la síntesis de coenzima Q y su implicación en el metabolismo mitocondrial	129

Tabla 1. Síndromes clásicos de enfermedades mitocondriales.....	19
Tabla 2. Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	136
Tabla 3. Cepa de ratón utilizada.....	138
Tabla 4. Cultivos primarios de fibroblastos utilizados.....	139
Tabla 5. Líneas celulares utilizadas.....	140
Tabla 6. Cebadores usados para clonajes	166
Tabla 7. Cebadores usados para detección en PCR/secuenciación y mutagénesis	167
Tabla 8. Cebadores usados para PCR a tiempo real.....	168
Tabla 9. Construcciones y plásmidos utilizados	170
Tabla 10. Anticuerpos utilizados	171

Abreviaturas

ADCK	aaarf domain containig kinase	IPP	Inosil pirofosfato
APT	Aprataxina	IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
CIF	Inhibidor de fosfatasas	LB	Medio Luria-Bertani
CPTII	Carnitil palmitoil transferasa	LDH	Lactato deshidrogenasa
DCIP	Diclorofenol indofenol	MADD	Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa múltiple
DHB	Decaprenil hidroxi benzoato	MTS	Señal de transporte a mitocondria
DMQ	Demetoxiubiquinol	NADH	Nicotín-adenin dinucleótido reducido
DTT	Ditiotreitól	NSHL	Pérdida auditiva sensorineural no sindrómica
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético	PEG	Polietilenglicol
EGTA	Ácido de etileno glicol tetraacético	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ETF	Flavoproteína de transporte de electrones	ROS	Especie reactiva de oxígeno
ETFDH	Flavoproteína deshidrogenasa de transporte de electrones	TE-OAE	emisión otoacústica transitoriamente evocada
ETFQO	Flavoproteína de transporte de electrones reductasa de ubiquinona	TLC	Cromatografía en capa fina
FAD	Flavín adenín dinucleótido	VLCAD	Acil CoA deshidrogenasa de cadena muy larga
FMN	Flavín mononucleótido	YPD	Extracto de levadura peptona- dextrosa
FPP	Farnesil pirofosfato	YPG	Extracto de levadura peptona- glicerol
GSH	Glutatión		
GST	Glutatión-S transferasa		
HADH	Hidroxiacil CoA deshidrogenasa		
HDF	Fibroblasto dermal humano		
HHB	Hexaprenil hidroxi benzoato		

Resumen

Dentro de las enfermedades raras, se agrupan una serie de patologías que tienen en común un mal funcionamiento de la mitocondria y se conocen con el nombre de enfermedades mitocondriales. Aunque por separado son poco frecuentes, en la población general su prevalencia en conjunto es de 1/5000. Las enfermedades mitocondriales se agrupan en una serie de síndromes, uno de los cuales es el síndrome de deficiencia de coenzima Q. El síndrome de deficiencia de coenzima Q puede ser causado por mutaciones en genes que intervengan directa o indirectamente en la ruta de síntesis del coenzima Q. Hasta la fecha se han descrito pacientes con mutaciones en genes que intervienen en la ruta de síntesis del coenzima Q (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *ADCK3* y *COQ9*) que originan deficiencias primarias de coenzima Q, y pacientes con mutaciones en genes que no intervienen en la síntesis del coenzima Q (*ETF*, *ETFDH*, *BRAF* y *APTX*), pero que provocan una deficiencia secundaria de coenzima Q.

En el presente trabajo describimos el gen *ADCK2* y su producto proteico, un miembro de la familia ABC1 de quinasas atípicas sobre el que prácticamente no hay información publicada. Solo existen estudios “*in silico*” que apuntan a una presunta función quinasa y un presunto papel en la ruta de síntesis del coenzima Q. Gracias a la colaboración de nuestro grupo con los grupos de investigación de la Dra. Elpeleg y la Dra. Jackson tuvimos acceso a muestras de fibroblastos de pacientes que portaban mutaciones en el gen *ADCK2*. Concretamente se trataron de dos hermanos en los que se producía la aparición de un codón de stop prematuro en heterocigosis, uno con un cuadro clínico bastante grave y otro en principio sin sintomatología; y un tercer paciente perteneciente a una familia distinta con una mutación puntual que provocaba el cambio de una prolina por una leucina.

Tras una caracterización fenotípica de dichos fibroblastos, usando como control fibroblastos de una persona sana y de otra con deficiencia secundaria de coenzima Q por una mutación en el gen *ETFDH*, pudimos detectar que en los fibroblastos de todos los pacientes con mutaciones en *ADCK2* se producía una deficiencia de coenzima Q. Tras obtener la primera evidencia de una relación entre *ADCK2* y coenzima Q, aparte de los estudios “*in silico*” ya citados, observamos en dichos fibroblastos una actividad

disminuida de los complejos I y II de la cadena respiratoria, un defecto en la β -oxidación de los ácidos grasos y en algunos casos una acumulación de lactato en el medio de cultivo y una menor masa mitocondrial. Todos estos datos nos sugirieron un defecto mitocondrial general. Además, en los fibroblastos con mutaciones en *ADCK2* pudimos observar una tasa de síntesis de coenzima Q elevada y, en general, un aumento en la expresión de los genes de la ruta de síntesis de coenzima Q.

Para poder demostrar el papel de *ADCK2* en la síntesis de coenzima Q apuntado anteriormente, realizamos estudios de sobreexpresión y silenciamiento transitorio de *ADCK2* en la línea celular MRC5. Observamos que en células no defectuosas como las MRC5, la sobreexpresión no tenía efectos sobre la síntesis de coenzima Q, pero si el silenciamiento, ya que hacía disminuir la tasa de síntesis de coenzima Q en un 50 %, una prueba directa de que *ADCK2* interviene en la síntesis del coenzima Q.

Adicionalmente se cuantificó el coenzima Q en la estirpe nula de *Saccharomyces cerevisiae* para el gen *YPL109c*, ortólogo a *ADCK2*, observándose que también tenía un déficit de coenzima Q del 40%. Además de ese déficit de coenzima Q, la estirpe nula, aunque capaz, tenía una leve dificultad para crecer en medios fermentables y mayor aún para crecer en medios no fermentables. También mostraba una actividad disminuida en los complejos I y I+III, pero una β -oxidación similar a la estirpe silvestre. Con la sobreexpresión del gen *YPL109c* y también del humano *ADCK2* se pudieron rescatar los niveles de coenzima Q de la estirpe silvestre, demostrando la complementación de *ADCK2* en levadura y su papel en la síntesis del coenzima Q. Sin embargo, la actividad de la cadena respiratoria no pudo recuperarse con la sobreexpresión de *YPL109c* ni *ADCK2*, indicando que puede tener una función adicional, además de en la síntesis de coenzima Q, quizás como estabilizadora de los supercomplejos, que no se lleva a cabo correctamente con la sobreexpresión. La sobreexpresión de las versiones de *YPL109c* y *ADCK2* que portaban las mutaciones encontradas en los fibroblastos de los pacientes no fueron capaces de recuperar ninguno de los parámetros medidos como defectuosos en la estirpe nula, e incluso en algunos casos empeoraban con la sobreexpresión de la proteína mutada.

De forma similar a la complementación de *ADCK2* en levaduras, fuimos capaces de recuperar parcialmente la cantidad de coenzima Q en los fibroblastos del paciente

con una mutación puntual en *ADCK2*. Esto se llevó a cabo mediante la transducción de estos fibroblastos con partículas lentivíricas que portaban un vector con el gen *ADCK2*. Tras la integración del vector en el genoma, la versión silvestre de *ADCK2* se expresó de forma permanente junto con la proteína GFP, que nos sirvió como marcador para seleccionar las células transducidas. La recuperación del coenzima Q no pudo ser total, probablemente porque la proteína mutada se continuaba expresando y también hay que tener en cuenta que la inserción del vector es aleatoria, pudiéndose producir nuevas mutaciones en el genoma. Con la recuperación del coenzima Q tanto en la estirpe nula en *YPL109c* de levadura, como en los fibroblastos del paciente con la mutación puntual en *ADCK2*, demostramos, de nuevo, la implicación de *ADCK2* en la síntesis del coenzima Q.

También realizamos una caracterización de *ADCK2* a nivel molecular, donde determinamos el perfil de expresión del gen en *Mus musculus*. Observamos una mayor expresión en los órganos que más dependían del metabolismo aeróbico y que presentaban una mayor cantidad de coenzima Q. También que su expresión en el desarrollo embrionario aumentaba durante la organogénesis y en el momento en que se produce un cambio del metabolismo anaeróbico al aeróbico, con la maduración de la membrana interna mitocondrial. Intentamos buscar la localización de la proteína *ADCK2* mediante técnicas de inmunofluorescencia y subfraccionamiento celular, llegando a la conclusión de que la proteína cumplía su función en la matriz o cara interna de la membrana interna mitocondrial, sin poder descartar que también pueda encontrarse en MAMs. En cuanto a la función bioquímica de *ADCK2* se descartó el que tuviera una actividad quinasa sobre sustratos susceptibles de ser fosforilados de manera genérica o una función pseudoquinasa sobre quinazoles comerciales. Su función específica no ha sido aún desvelada, pero si se trata de una quinasa debe tener actividad sólo sobre su sustrato específico.

Tras la caracterización desde el punto de vista clínico y desde el molecular, tenemos claro que *ADCK2* interviene en la síntesis de coenzima Q. Es más, debido a que la tasa de síntesis en los fibroblastos de los pacientes está elevada y que la estirpe nula en *YPL109c* tiene coenzima Q y es capaz de crecer en medios no fermentables, sabemos que *ADCK2* no interviene en uno de los pasos catalíticos de la ruta, ya que si

fuera así, la ausencia del gen debería acarrear una ausencia de coenzima Q, o su mutación un defecto en la tasa de síntesis, como ocurre con los genes de la ruta de síntesis del coenzima Q, *COQ2* y *COQ4*. Por tanto, *ADCK2* debe actuar con un papel regulatorio de la ruta de síntesis y mutaciones en él pueden provocar una deficiencia primaria de coenzima Q, pero que debe ser diferenciada de la causada por mutaciones en los genes catalíticos de la ruta de síntesis (genes *COQ*), ya que dichas mutaciones provocan la ausencia de coenzima Q en las estirpes nulas de levadura. El término deficiencia primaria indirecta de coenzima Q es el término que proponemos para denominar esta clase de deficiencias de coenzima Q encontrada en los pacientes descritos.

SUMMARY

Within rare diseases there are a group of pathologies that have in common a malfunction of the mitochondrion. This group of pathologies is known as mitochondrial diseases. Although each pathology is slightly frequent, in the general population their prevalence as a whole is 1/5000. Mitochondrial diseases are gathered in crowds of syndromes. One of them is the syndrome of coenzyme Q deficiency. This syndrome can be caused by mutations in genes which are directly or indirectly involved in the route of synthesis of the coenzyme Q. Up to the date, there are some patients described with mutations in genes that are involved in the route of syntheses of the coenzyme Q (PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ4, COQ6, ADCK3 and COQ9) that generate primary deficiencies of this molecule. However, there are also patients described with mutations in genes that do not participate in the synthesis such as ETF, ETFDH, BRAF and APTX but whose alteration causes a secondary deficiency of coenzyme Q.

In the present work we describe the gene ADCK2 and its protein. This molecule is a member of the family ABC1 of atypical kinases from whom there is almost no information published. There are only some studies "in silico" that point at an expected kinase function and a supposed role in the route of biosynthesis of coenzyme Q. Thanks to the collaboration of our group with the researching groups of Dra. Elpeleg and Dra. Jackson, we had access to samples of fibroblasts of patients who were carrying mutations in the gene ADCK2. Concretely we took cells from two brothers whose mutation produces the emerge of a premature stop codon sign in heterozygosis. One of the siblings had severe clinical symptoms while the other one showed no significant symptomatology. In addition, we found a third patient belonging to a different family with a mutation belonging to a different family with a punctual mutation that was provoking the change of a proline for a leucine.

After a phenotypic characterization of patients fibroblasts, using as control fibroblasts from a healthy person and of another one with a secondary deficiency of coenzyme Q generated by a mutation in the gene ETFDH, we could detect a significant deficiency of coenzyme Q in these cells. After obtaining the first evidence of a correlation between ADCK2 and coenzyme Q, apart from the studies "in silico" mentioned above, we observe a diminished activity of the complexes I and the II of the

respiratory chain, a deficiency in its β - oxidation of the oily acids and in some cases an accumulation of lactate in the culture medium. All this results suggested us the existence of a mitochondrial deficiency in general. In addition, in ADCK2 mutated fibroblasts we could observe an increased rate of biosynthesis of coenzyme Q, and in general, an increase in the expression of genes involved in the route of biosynthesis of coenzyme Q.

To be able to demonstrate the role of ADCK2 in the synthesis of coenzyme Q aimed previously, we realized studies of overexpression and transitory knocking down of ADCK2 in the cellular line MRC5. We observe that in not defective cells as MRC5, the overexpression of the gene did not have effects on the synthesis of coenzyme Q. However, we observed that the knocking down has a significant effect, since it was generating a 50% decrease of the rate of synthesis of coenzyme Q. A direct proof of that ADCK2 intervenes in the synthesis of this molecule.

Additionally, coenzyme Q was quantified in the knock out strain of *Saccharomyces cerevisiae* for the gene YPL109c, orthologous of ADCK2. We observed that it showed a deficit of coenzyme Q of 40 %. In addition, this knock out strain, although it was capable, it had a slight difficulty to grow in fermentable mediums and especially when it grows in not fermentable mediums. These cells were showing a diminished activity in the complexes I and I+III, but the β – oxidation was similar to the wild type. With the overexpression of the gene YPL109c and also of the human gene ADCK2 the levels of coenzyme Q could be rescued to the wild type rate, demonstrating the complementation of ADCK2 in yeast and its role in the synthesis of the coenzyme Q. Nevertheless, the activity of the respiratory chain could not be recovered with the overexpression of YPL109c or the human ADCK2, indicating that the protein could have an additional function, probably as a stabilizer of the supercomplexes, function which is not carried out correctly after the overexpression. The overexpression of the versions of YPL109c and ADCK2 that were carrying the mutations found in patients fibroblasts were not able to recover any of the parameters indicated as in the knock out strain, and even in some cases these values were even decreased after the overexpression of the mutated protein.

In a similar way to the complementation of ADCK2 in yeasts, we were able to partially recover the quantity of coenzyme Q in patients fibroblasts with a punctual mutation in ADCK2. This experiment was carried out by the transduction of these fibroblasts with lentiviral particles that were carrying a vector with the gene ADCK2. After the integration of the vector in the genome, the wild version of ADCK2 was expressed in permanent form together with the protein GFP, which served us as a report to select transfected cells. The recovery of coenzyme Q was not complete, probably because the mutated protein was still being expressed. It is also necessary to keep in mind that the insertion of the vector is random, being able to produce new mutations within the genome; fact that could explain this uncompleted recovery. With the recovery of the coenzyme Q in the knock out yeast strain YPL109c and in patients fibroblasts with the punctual mutation in ADCK2, we demonstrate again the implication of this gene in the synthesis of the coenzyme Q.

We also carried out a characterization of ADCK2 at a molecular level, where we determined the profile of expression of the gene in *Mus musculus*. We observe a major expression of the gene in the organs that were more depending of the aerobic metabolism and that were presenting a major quantity of coenzyme Q. We also observed that its expression in the embryonic development was increasing during the organogenesis and at the moment in which a change of the anaerobic metabolism to the aerobic one happens. We tried to look for the location of the protein ADCK2 by techniques of immunofluorescence and cellular subdivision, coming to the conclusion that the protein was carrying out its function in the matrix or in the mitochondrial inner membrane. However we are not able to reject it could be at MAMs level.

In relation to biochemical function of ADCK2, we discarded the hypothesis that it had a kinase activity over substrata capable of being fosforilated as well as a pseudokinase function over commercial kinases. Its specific function has not been revealed yet, but if it is a kinase, it must have activity only over its specific substratum.

After the characterization from the clinical and molecular point of view, we have clear that ADCK2 is involved in the synthesis of coenzyme Q. What is more, due to the fact that the rate of synthesis observed in the patients fibroblasts is raised and that the knock out strain in YPL109c has coenzyme Q and it is able to grow in not fermentable

mediums, we know that ADCK2 is not involved in one of the catalytic steps of the route. In this case, the absence of the gene should generate an absence of coenzyme Q, and its mutation a deficit in the rate of synthesis, like it happens with the genes of the route of synthesis of the coenzyme Q, COQ2 and COQ4. Therefore, ADCK2 must present a regulative role in the route of synthesis and mutations in this gene can provoke a primary deficiency of coenzyme Q. However, this deficiency must be differentiated from the one caused by mutations in the catalytic genes of the route of synthesis (genes COQ), since the mutations mentioned above provoke the complete absence of coenzyme Q in the knock out strains of yeast. The term 'primary indirect deficiency' of coenzyme Q is the term we propose to name this type of deficiencies of coenzyme Q found in the described patients.

INTRODUCCIÓN

1. Las enfermedades mitocondriales

Bajo el nombre de enfermedades mitocondriales o encefalomiopatías mitocondriales se agrupan una serie de síndromes que tienen en común un mal funcionamiento de la mitocondria. Esta disfunción mitocondrial puede ser adquirida o transmitida genéticamente y muchos de los síntomas aparecen en la infancia, aunque también hay un buen número de ellos que aparecen en la edad adulta. Las enfermedades mitocondriales tienen, por tanto, un carácter altamente heterogéneo en lo que respecta a las causas, sintomatología y tratamiento.

Las enfermedades mitocondriales afectan primero a los tejidos que requieren de una mayor demanda metabólica y dependen del metabolismo aeróbico y que, por tanto, tienen un mayor número de mitocondrias. Ejemplos de estos tejidos son el nervioso, muscular, cardíaco, ocular o sistema endocrino (Keogh & Chinnery, 2013). Los signos y síntomas típicos de las enfermedades mitocondriales son tan diversos como fragilidad muscular, espasticidad, calambres, fatiga, fallo cardíaco, caída del párpado, sordera, ceguera, epilepsia, desórdenes mentales, fallo renal, fallo hepático, diabetes, migrañas, problemas de desarrollo, nutricionales o del sueño (Noorda et al., 2012).

1.1. Las enfermedades mitocondriales son causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial y en el ADN nuclear

Como ya hemos apuntado, las enfermedades mitocondriales se presentan bajo una gran diversidad de signos y síntomas. Algunos pacientes pueden encuadrarse dentro de un fenotipo de enfermedad mitocondrial (síndrome) bien definido como por ejemplo MERRF, otros pacientes sin embargo son llamados “oligosintomáticos”, ya que solo presentan uno o dos de los síntomas clásicos de un síndrome y el diagnóstico en estos casos se complica. Sin embargo los pacientes más complicados de diagnosticar, son los que presentan un cuadro clínico “no específico” como por ejemplo, epilepsia, diabetes o sordera sensorineural, que no encaja dentro de ningún síndrome concreto.

Los síndromes clásicos de enfermedades mitocondriales se resumen en la siguiente tabla (Keogh & Chinnery, 2013):

Tabla 1

Síndrome	Características principales
CPEO	Oftalmoplejía externa progresiva y ptosis bilateral
Kearns-Sayre	Inicio de CPEO antes de los 20 años con retinopatía pigmentaria y uno de estos síntomas; Proteína en LCR >1g/L, ataxia cerebelar o bloqueo del corazón
MELAS	Encefalopatía con convulsiones y/o demencia, miopatía mitocondrial en biopsia muscular y acidosis láctica
MERRF	Mioclonus, convulsiones, encefalopatía y ataxia
NARP	Retinopatía pigmentaria, ataxia y neuropatía periférica
MNGIE	Dismotilidad gastrointestinal, caquexia, neuropatía periférica, ptosis y SNHL
OPA1	Pérdida de visión sin dolor o asintomática
LHON	Fallo visual bilateral subagudo sin dolor
Síndrome de Leigh	Encefalopatía cerebelar o del tronco del encéfalo que se presenta en la infancia
POLG	Ataxia cerebelar o sensorial

En una célula, además del ADN nuclear (ADNn), en las mitocondrias existe el ADN mitocondrial (ADNmt). Cada mitocondria tienen entre 2 y 5 copias de ADNmt. Se trata de un ADN circular, de doble cadena, de 16.6Kb, que codifica para 13 subunidades estructurales de la cadena respiratoria y la maquinaria necesaria para la síntesis proteica intramitocondrial (22 ARNt y 2 ARNr) (Alexander Fraser, Biousse, & Newman, 2010; McFarland, Taylor, & Turnbull, 2010). Mutaciones en el ADNmt provocan síndromes que se engloban dentro de las enfermedades mitocondriales como se puede observar en la figura 1.

Un tercio de las enfermedades mitocondriales causadas por problemas en el ADNmt suelen ser de tipo esporádico, generalmente debido a una delección en el ADNmt, mientras que dos tercios son debidos a una mutación puntual transmitida por herencia materna (PF Chinnery, 2002).

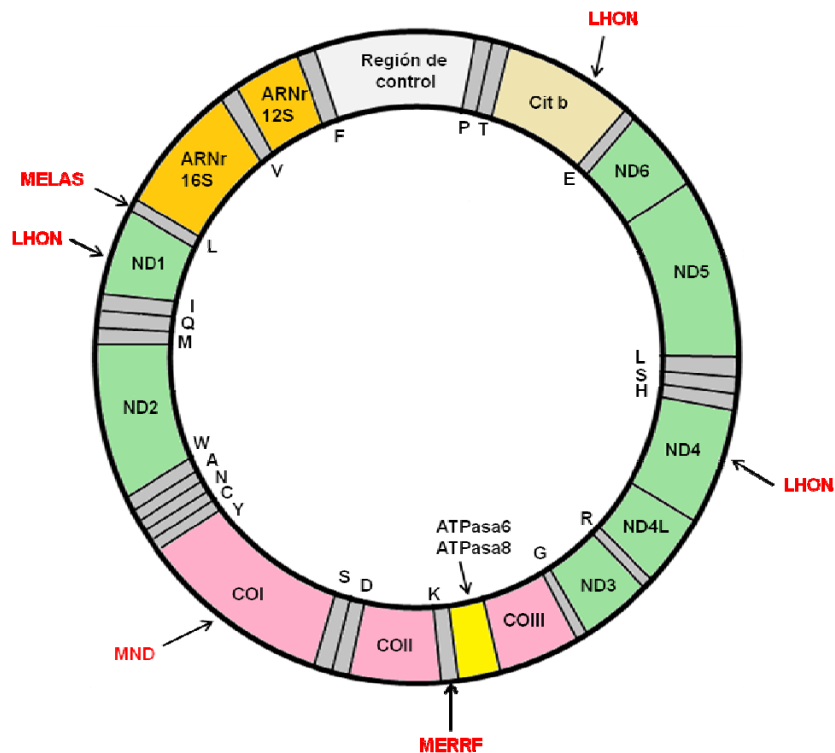


Figura 1. Esquema del ADNmt con algunas de las mutaciones que provocan la aparición de algunos síndromes. Se representan los productos derivados del ADNmt. Los 22 ARNr se representan con una letra correspondiente a su aminoácido. En naranja los dos ARNr. En verde las proteínas necesarias para el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. En marrón la proteína necesaria para el complejo III. En rosa las proteínas necesarias para el complejo IV. En amarillo las proteínas necesarias para el complejo V. En rojo se señalan los síndromes causados por mutaciones en esas regiones del ADNmt.

Es importante tener presente el concepto de heteroplasmia. En un individuo con una enfermedad mitocondrial debido a mutaciones en el ADNmt, coexisten copias de ADNmt que portan la mutación y copias de ADNmt sin mutaciones, en ese caso se utiliza el término heteroplasmia. Por el contrario, cuando se trata de un individuo sano, éste presenta una población de ADNmt uniforme y se utiliza el concepto de homoplasia. Cuando se sobrepasa un valor umbral de heteroplasia en un determinado tejido, la patología se hace presente. La variabilidad en este nivel umbral es la causa de la gran variabilidad en las manifestaciones clínicas de cada paciente. De hecho, es habitual encontrar mutaciones en el ADNmt, pero en una baja proporción, por lo que el tejido puede ser considerado como homoplásmico y por tanto sin patología. La prevalencia general de enfermedad mitocondrial es de 1/5000 (Rahman, 2012). La prevalencia de la enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en el ADNmt es de 9.2/100000 en la población general menor de 65 años y de 16.5/100000

en la población general menor de 65 años con antecedente materno de enfermedad mitocondrial (McFarland et al., 2010).

Sin embargo las enfermedades mitocondriales no solo están causadas por mutaciones en el ADNmt, sino también por mutaciones en el ADNn; de hecho la mayoría de las 1500 proteínas mitocondriales son sintetizadas por genes nucleares. Se han descrito mutaciones en más de 80 genes nucleares que provocan una patología mitocondrial (Rahman, 2012). Ejemplos son las mutaciones encontradas en genes estructurales de los complejos respiratorios I, II, III y IV, en genes que codifican para factores de ensamblaje de dichos complejos o mutaciones en el gen TIMM8A que provoca el síndrome DDOM (Kojovic et al., 2013). Otros ejemplos de genes nucleares que al ser mutados pueden provocar una enfermedad mitocondrial son POLG, OPA1, PDHA1, ETFDH o los genes de la ruta de biosíntesis del coenzima Q (McFarland et al., 2010) como comentaremos más adelante.

1.2 Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades mitocondriales

Para el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial se deben realizar test para analizar parámetros que frecuentemente se encuentran alterados en los pacientes con enfermedades mitocondriales, aunque hay que tener en cuenta que la inexistencia de una alteración no descartaría la existencia de la enfermedad. Recurrentes deben ser los análisis de sangre, donde deben ser medidos el nivel de lactato, la creatina quinasa, la glucosa, creatina, urea o acil-carnitinas. Igualmente debe ser examinado el líquido cefalorraquídeo, el estado audiométrico, el estado neurofisiológico, el cardiológico y el oftalmológico. También son muy importantes los estudios histológicos, especialmente en el músculo esquelético. La presencia de un patrón de fibras musculares deficientes en citocromo c oxidasa o la presencia de fibras rojas rasgadas son evidencias clave de la presencia de una enfermedad mitocondrial (McFarland et al., 2010). Es importante conocer la información de la historia familiar para estudiar la posible herencia genética, así como conocer el grado de heteroplasmia en el caso de deberse a mutaciones en el ADNmt. A nivel molecular la medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria o la cantidad total de coenzima Q son elementos muy importantes para el diagnóstico. Por último, gracias a nuevas técnicas y el desarrollo

informático del software necesario, la secuenciación, no solo del ADNmt, sino también del exoma o genoma completo, en busca de la mutación concreta que puede estar causando la enfermedad es de gran ayuda no solo para el diagnóstico del paciente, si no para la investigación biomédica y su implicación en el tratamiento de futuros pacientes.

Para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales hasta ahora no existen medicamentos específicos que claramente se hayan visto eficaces para tratarlas a largo plazo (P Chinnery, Majamaa, Turnbull, & D, 2006; McFarland et al., 2010), por lo que la atención se ha centrado en atacar los síntomas como, por ejemplo, combatir la acidosis láctica con bicarbonato sódico y dicloroacetato, o anticonvulsivos como el clonazepam para los ataques epilépticos (McFarland et al., 2010).

Como hemos comentado, el uso de terapias globales contra las enfermedades mitocondriales son muy limitadas, sin embargo, dentro de las enfermedades mitocondriales, el subgrupo del síndrome de deficiencia de coenzima Q es el menos dificultoso de tratar. Hay algunos casos de mejora de la fatiga y alivio de la mialgia mediante la administración de coenzima Q o su análogo idebenona, con dosis altas de hasta 3000mg/día, siendo especialmente útil la administración de coenzima Q en el tratamiento de deficiencias primarias de coenzima Q (Alexander Fraser et al., 2010).

La riboflavina o vitamina B₂ es el precursor y componente principal de las coenzimas FAD y FMN, que son requeridos como cofactores por las flavoproteínas implicadas en la β -oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de los aminoácidos, el ciclo de Krebs o la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Al aumentar la cantidad de FAD intramitocondrial se favorece la actividad catalítica de las flavoproteínas así como su plegamiento y/o estabilidad. De esta forma, por ejemplo, se puede compensar la disminuida actividad de flavoproteínas mutantes. Los trastornos en el complejo I son los más comunes dentro de la cadena respiratoria y provocan un cuadro clínico heterogéneo. El tratamiento con riboflavina puede mejorar la actividad del complejo I, ya que éste contiene FMN como grupo prostético (Bernsen, Gabreëls, Ruitenbeek, & Hamburger, 1993; Scholte et al., 1995). Además de al complejo I, la riboflavina ayuda también al ensamblaje del complejo IV (Gerards et al., 2011).

La riboflavina también es eficaz en el tratamiento de la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa múltiple (MADD), también llamada acidemia glutárica de tipo II, que es un desorden autosomal recesivo del metabolismo de los ácidos grasos y los aminoácidos debido a un defecto en el transporte de electrones desde deshidrogenasas que usan FAD como cofactor al coenzima Q (Rita Horvath, 2012). La MADD provoca la acumulación de lípidos en el hígado y músculo esquelético, cetoacidosis, hipoglucemia, y a veces cardiomiopatía (Lämmer, Rolinski, Ahting, & Heuss, 2011), así como una deficiencia en las actividades de los complejos I y II+III principalmente (Rita Horvath, 2012). Uno de sus signos más evidente es la acumulación en sangre de acil-carnitinas de cadena corta, media y larga. El perfil de acil-carnitinas en los pacientes puede fluctuar, pero es anormal tanto en pacientes sintomáticos como en los asintomáticos. Un ejemplo sería la MADD causada por mutaciones en la enzima del primer paso de la β -oxidación, la acil-CoA deshidrogenasa. También puede ser provocada por una disfunción en las proteínas codificadas por *ETF* o *ETFDH* o por un, hasta ahora no identificado, defecto en el metabolismo o transporte de las flavinas (Liang et al., 2009). Para el tratamiento de la MADD, además de riboflavina, se utiliza el tratamiento con L-carnitina (3g/día generalmente) para ayudar al metabolismo de los ácidos grasos, o un tratamiento combinado de riboflavina y L-carnitina, ya que una de las consecuencias del síndrome MADD es la baja cantidad de carnitina libre. En algunos pacientes con MADD debido a mutaciones en *ETFDH* también se ha realizado un tratamiento combinado de riboflavina y coenzima Q con una mejora significativa de los parámetros afectados (Gempel et al., 2007).

La vitamina C (4g/día) y el menadiol difosfato (40mg/día) se usan como aceptores de electrones en pacientes con acusada intolerancia al ejercicio y miopatía mitocondrial relacionada con la baja actividad del complejo III para ceder los electrones al complejo IV (Alexander Fraser et al., 2010).

La prescripción de arginina para el tratamiento agudo de ictus y como profilaxis de accidentes vasculares está aumentando debido a los casos exitosos conseguidos en Japón, aunque los resultados son muy variables entre individuos en cuanto al intervalo entre episodios (Koga, Akita, Nishioka, & Al., 2005).

Por último, el uso de antioxidantes en general, solos o combinados, para combatir el estrés oxidativo provocado por la enfermedad mitocondrial es algo común. Ejemplos son, además del coenzima Q, el ácido α -lipoico o la vitamina E. (Alexander Fraser et al., 2010)

2. El coenzima Q y su implicación en la patología mitocondrial

El coenzima Q (ubiquinona, Q o CoQ) es un lípido presente en todos los organismos y que juega un papel esencial en el metabolismo bioenergético gracias a su capacidad redox. Fue aislado y caracterizado por Festeinstein (Festenstein, Heaton, Lowe, & Morton, 1955) y establecido como un componente de la cadena respiratoria mitocondrial por Crane dos años más tarde (Crane, Hatefi, Lester, & Widmer, 1957). En 1961 se descubrió su carácter universal tanto en plantas como en animales, acuñándose el término de ubiquinona (Morton, 1961). El coenzima Q es también un componente esencial de la membrana plasmática en procariotas (Olson & Rudney, 1983). Además de en la respiración celular, actúa como aceptor de electrones a partir de β -oxidación de los ácidos grasos (Frerman, 1988), la síntesis de uridina (Nagy & Lacroute, 1992), la oxidación de sulfuro a sulfato (Hildebrandt & Grieshaber, 2008) y como cofactor de las proteínas desacoplantes de la bomba de protones mitocondrial (Echtay, Winkler, & Klingenberg, 2000). Como hemos comentado anteriormente, el déficit de esta importante molécula puede acarrear una patología que se engloba dentro de las encefalomiopatías mitocondriales.

2.1. Estructura y funciones del coenzima Q

El coenzima Q consta de un anillo bencénico, hidroxilado en las posiciones uno y cuatro, polar, y por tanto soluble; y de una cadena isoprenoide hidrofóbica, de longitud variable, en la posición tres, formada por monómeros de isopreno que le confiere el carácter hidrófobo a la molécula. El número de isoprenos presentes en la cadena isoprenoide del coenzima Q varía según la especie y esto le confiere un nombre diferente en cada una de ellas. En humanos la cola consta de diez unidades de isopreno (coenzima Q₁₀), en *E. coli* de ocho (coenzima Q₈), en *Saccharomyces*

cerevisiae de seis (coenzima Q₆) o en *Caenorhabditis elegans* de nueve (coenzima Q₉). En algunas especies coexisten coenzima Q de distinta longitud de cadena, como por ejemplo en *Mus musculus* donde encontramos coenzima Q₉ y coenzima Q₁₀.

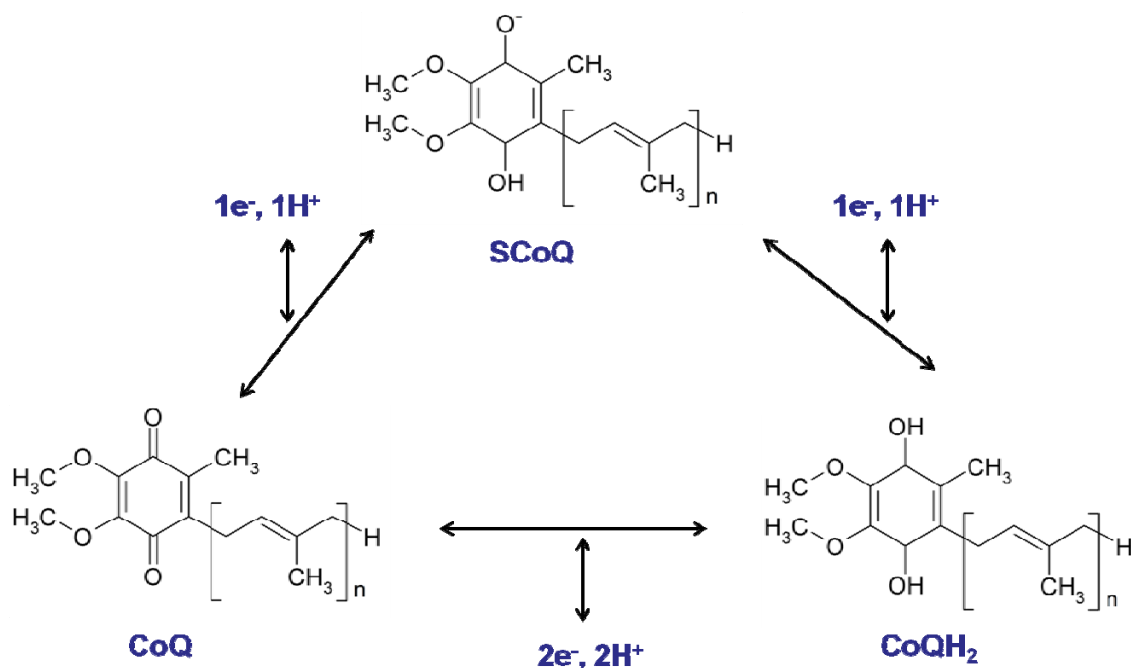


Figura 2. Ciclo de oxido-reducción del coenzima Q. La ubiquinona (CoQ) se reduce a semiubiquinona (SCoQ) y posteriormente a ubiquinol (CoQH₂), o directamente a ubiquinol, siendo todos los pasos reversibles.

El coenzima Q varía entre su forma oxidada y su forma reducida como puede observarse en la figura 2. A la forma oxidada se le denomina ubiquinona, mientras que a la forma reducida se le denomina ubiquinol. Existe también una forma intermedia entre ambos estados de oxidación de la molécula, que recibe el nombre de semiubiquinona. El coenzima Q, por tanto, realiza su función de transporte de electrones mediante ciclos de oxidación y reducción (Crane et al., 1957).

La principal función de esta benzoquinona isoprenilada es la de formar parte de la cadena respiratoria mitocondrial, aceptando los electrones provenientes del complejo I o del complejo II y, ya en forma de ubiquinol, cederlos al complejo III (Mitchell, 1975), como se puede observar en la figura 3. El transporte electrónico comienza cuando el NADH generado en el ciclo de Krebs cede dos electrones al complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y de este al coenzima Q, posibilitando el transporte de 4H⁺ desde la matriz al espacio intermembrana a través del complejo I.

A partir de la oxidación del succinato a fumarato se ceden dos electrones al complejo II (Succinato-ubiquinona oxidorreductasa) que posteriormente también son cedidos al coenzima Q. Una vez que el coenzima Q ha sido reducido, bien por el complejo I o por el II, cede dos electrones al complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa) provocando el bombeo de dos H^+ al espacio intermembrana a los que hay que añadir otros dos liberados por el coenzima Q al oxidarse. Finalmente a través del citocromo c llegan los electrones al complejo IV (citocromo c oxidasa), cediendo un electrón al complejo IV. Son necesarias cuatro moléculas de citocromo c para que el complejo IV reduzca una molécula de oxígeno molecular hasta agua, tras ceder cuatro electrones. Esto provoca el bombeo de cuatro H^+ más al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico generado por la acumulación de H^+ en el espacio intermembrana provoca que el complejo V (ATP sintasa mitocondrial) bombee los H^+ de nuevo a la matriz provocando la fosforilación del ADP al ATP en un proceso denominado fosforilación oxidativa.

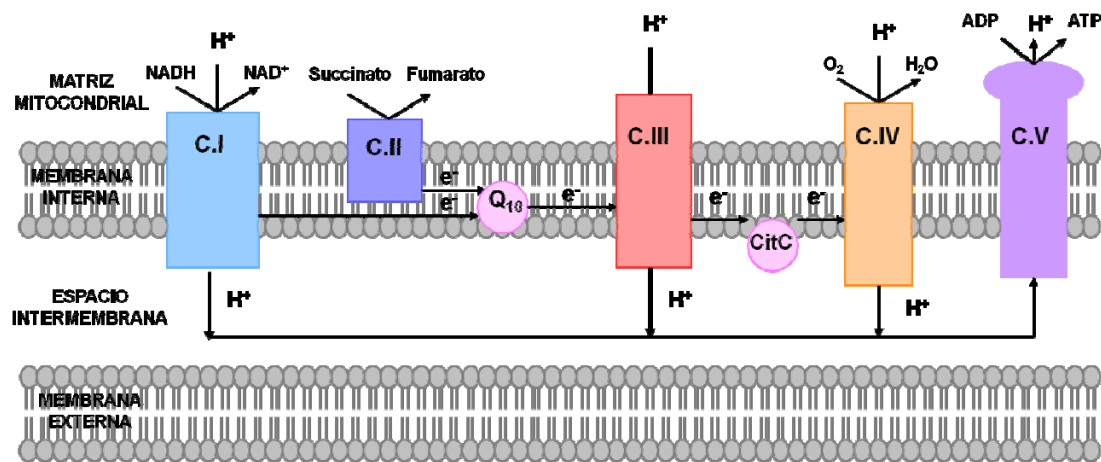


Figura 3. Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se representa el transporte electrónico desde el complejo I al complejo IV, donde se termina reduciendo el O_2 a H_2O . El gradiente de H^+ generado provoca la síntesis de ATP mediante el proceso denominado como fosforilación oxidativa.

Una función adicional del coenzima Q en la cadena de transporte de electrones es la de estabilización del complejo III. Levaduras sin CoQ_6 muestran inestabilidad en el complejo III (Santos-Ocana, Do, Padilla, Navas, & Clarke, 2002). El complejo III tiene dos sitios de unión a coenzima Q (Q_i y Q_o) con el fin de estabilizar el radical

semiquinona producido en el tránsito de los dos electrones del coenzima Q al citocromo *c*, que es capaz tan sólo de aceptar un electrón (Bartoschek et al., 2001).

El coenzima Q también actúa como transportador de electrones en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas por la vía del orotato (Jones, 1980). En el citosol, la dihidroorotasa cataliza el paso de N-carbamil aspartato a dihidroorotato, que en la mitocondria es oxidado por la dihidroorotato deshidrogenasa hasta orotato, provocando la cesión de dos electrones al coenzima Q que queda reducido como ubiquinol. El orotato actúa como sustrato para la síntesis de pirimidinas. El coenzima Q en la cadena de transporte mitocondrial recibe electrones, además del complejo I y complejo II y de la dihidroorotato deshidrogenasa, de la β -oxidación de los ácidos grasos por la vía ETF/ETFDH, cediéndolos únicamente al complejo III.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas formadas por oxígeno que potencialmente pueden dañar a la célula mediante la oxidación de ADN, proteínas o la peroxidación de lípidos. Ejemplos de especies ROS son el radical superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los antioxidantes son moléculas con la capacidad de reducir el estrés oxidativo provocado por las ROS, bien previniendo la formación de estas moléculas o directamente eliminándolas. El coenzima Q actúa como antioxidante de diversas membranas celulares previniendo la oxidación de lípidos, proteínas o ADN, siendo el único antioxidante liposoluble sintetizado por la célula (Bentinger, Tekle, & Dallner, 2010). También regenera otros antioxidantes exógenos como el ascorbato y el tocoferol (A. Arroyo & F. Navarro, 2000; B. A. Arroyo et al., 2004; Frei & Kim, 1990; Frei, 1999). El coenzima Q participa en el sistema redox de la membrana plasmática donde regula a la NADH-oxidasa, que a su vez regula el ratio $NAD^+/NADH$ citosólico y la reducción de ascorbato. Además está implicada en la regulación de la diferenciación y el crecimiento celular (Gómez-Díaz et al., 1997).

Por otra parte, el coenzima Q es un factor esencial para la activación de proteínas desacoplantes (Echtay et al., 2000). Estas proteínas se encuentran en la membrana interna mitocondrial y pueden disipar el gradiente de H^+ generando calor en vez de ATP a través de la ATP sintasa.

También se tiene constancia de que el coenzima Q tiene un papel esencial en la regulación de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

(PTPm) (Fontaine, Ichas, & Bernardi, 1998). El PTPm es un canal por el que se puede realizar una rápida salida de Ca_2^+ desde la mitocondria. Dependiendo del tamaño de la cola isoprenoide, el coenzima Q puede inducir o inhibir su apertura. La larga cola isoprenoide del CoQ_{10} inhibe la apertura del canal, impidiendo la salida de Ca_2^+ , la despolarización del potencial de membrana, la activación de las caspasas y, por tanto, de la apoptosis (Green & Reed, 1998).

La captura de coenzima Q por parte de monocitos y linfocitos provoca la liberación de sustancias mediadoras a la sangre modificando la expresión de genes dependientes de NF κ B1 y ejerciendo efectos antiinflamatorios (Schmelzer, Lindner, Vock, Fujii, & Döring, 2007).

Se ha demostrado también, que el coenzima Q tiene propiedades antiateroscleróticas al proteger al LDL de la oxidación. Por otra parte reduce los niveles de peroxidasas lipídicas asociadas a lipoproteínas en lesiones ateroscleróticas. Además disminuye los niveles de integrina- β 2 CD11b en monocitos, que contrarresta la interacción monocito-célula endotelial (Thomas, Neuzil, & Stocker, 1996; Turunen et al., 2002).

Por último el coenzima Q también estimula la liberación de NO endotelial, ayudando a contrarrestar la disfunción endotelial (Hamilton, Chew, & Watts, 2007). En levaduras media en la oxidación de sulfito y en bacterias en la introducción de puentes disulfuro en las proteínas (Turunen, Olsson, & Dallner, 2004).

2.2 Biosíntesis del coenzima Q en eucariotas

El coenzima Q es una molécula que es sintetizada en la mitocondria y que podemos encontrarla en la membrana interna mitocondrial, aunque a partir de la mitocondria también es distribuida hacia otras membranas a través del sistema de transporte de endomembranas (Fernandez-Ayala, Brea-Calvo, Lopez-Lluch, & Navas, 2005; S Padilla et al., 2009). La síntesis del coenzima Q parte de dos elementos distintos, ya que por una ruta se sintetiza la cola isoprenoide y por otra el anillo bencénico, como se observa en la figura 4. Los primeros pasos de la síntesis de ambos

elementos además de en la mitocondria, se pueden producir en el retículo endoplasmático y peroxisomas (Bentinger et al., 2010).

A partir del aminoácido tirosina se sintetiza la cabeza polar del coenzima Q, al dar lugar en varios pasos al p-hidroxibenzoato, aunque en levaduras la síntesis también puede ocurrir a partir de corismato por la vía del shikimato (Goewert, 1980). El p-hidroxibenzoato siempre es sintetizado en exceso, por lo que el paso limitante para la síntesis del coenzima Q es la síntesis de la cola isoprenoide (Bentinger et al., 2010).

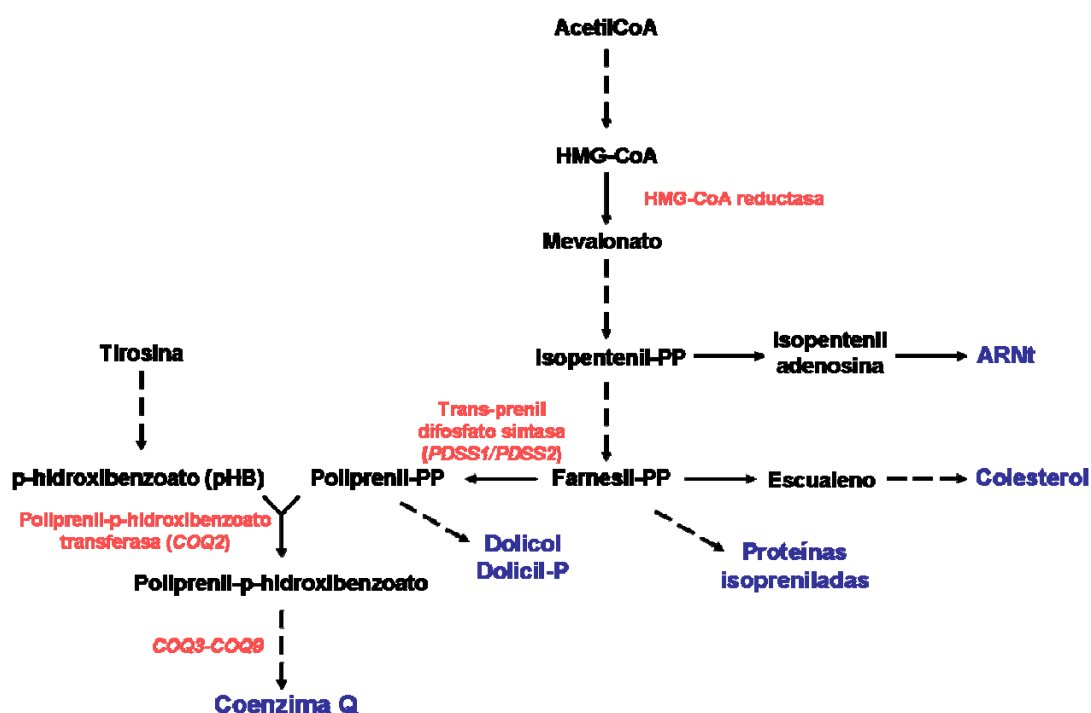


Figura 4. Biosíntesis de los precursores del coenzima Q. El precursor de la cabeza bencénica del coenzima Q (pHB) se sintetiza a partir de tirosina y la cola isoprenoide (poliprenil-PP) a partir de acetilCoA a través de la ruta del mevalonato.

Para la síntesis de la cadena isoprenoide del coenzima Q se ve implicada la ruta de síntesis del mevalonato, que es una ruta utilizada para la síntesis de otros lípidos además del coenzima Q como, por ejemplo, el colesterol. A partir de acetilCoA se sintetiza farnesil-pirofosfato (FPP) que es una molécula utilizada como precursor en varios procesos como la síntesis de colesterol, la síntesis de ARNt, la isoprenilación de proteínas o la síntesis de dolicol y dolicol fosfato (Bentinger et al., 2010). La isoprenilación de proteínas se relaciona con señales de transducción y localización de las proteínas y el dolicol y dolicol fosfato intervienen en el proceso de glicosilación de

las proteínas. De hecho, el uso de estatinas para reducir el colesterol en pacientes con hipercolesterolemia pueden reducir el nivel de coenzima Q, ya que las estatinas actúan sobre un elemento de la ruta del mevalonato común a ambos procesos como es la HMG-CoA reductasa. Se ha observado que el uso de estatinas en ratones disminuye la cantidad de coenzima Q en diversos tejidos (Löw, Andersson, Edlund, & Dallner, 1992; Mörrck et al., 2009). El FPP generado por la ruta del mevalonato se condensa con varias moléculas de isopentenil priofosfato (IPP), todas en configuración *trans*, gracias a la *trans*-prenil difosfato sintasa o *PDSS1/PDSS2*, dando lugar a la cadena poliisoprenoide de distinta longitud dependiendo de la especie donde ocurra la síntesis (Tran & Clarke, 2007). La cadena isoprenoide y el pHB se fusionan dando lugar al poliprenil-p-hidroxibenzoato gracias a la poliprenil-p-hidroxibenzoato transferasa o *COQ2*.

Una vez fusionados el anillo benzoquinónico y la cola isoprenoide, se llevan a cabo modificaciones en el anillo por parte del resto de productos proteicos de los genes *COQ* como se observa en la figura 5. Dentro de los eucariotas, donde mejor se ha caracterizado la síntesis de coenzima Q ha sido en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se han generado grupos de complementación deficientes en coenzima Q. Cada grupo se compone de diversas estirpes que muestran mutaciones en un mismo gen de la síntesis de coenzima Q y son incapaces de crecer en una fuente de carbono no fermentable como el glicerol, además de tener un déficit de coenzima Q. Hay diez grupos de complementación que se corresponden con los diez genes *COQ* implicados en este proceso, los ya citados *COQ1* (genes *PDSS1/PDSS2* en humanos) y *COQ2*, y los genes de *COQ3* a *COQ10*. Los genes homólogos en mamíferos se han identificado por homología y en los casos de *COQ2*, *COQ3* y *COQ7* las proteínas humanas han podido complementar la función del gen nulo de levadura (Forsgren et al., 2004; Jonassen & Clarke, 2000; Vajo et al., 1999). Mientras que las proteínas Coq1, Coq2, Coq3, Coq5, Coq6 y Coq7 tienen una función conocida o propuesta, no está claro que Coq4, Coq8 (también llamado ADCK3 o CABC1 en humanos) y Coq9 posean una actividad catalítica. Por otra parte, el mutante nulo *COQ10*, a diferencia de los restantes mutantes nulo, tiene unos niveles normales de coenzima Q, indicando que Coq10 no se requiere para la síntesis de coenzima Q, si no que puede ser requerido como una chaperona de

unión al coenzima Q que podría transportarlo a su localización en la cadena de transporte mitocondrial (Barros et al., 2005; Cui & Kawamukai, 2009).

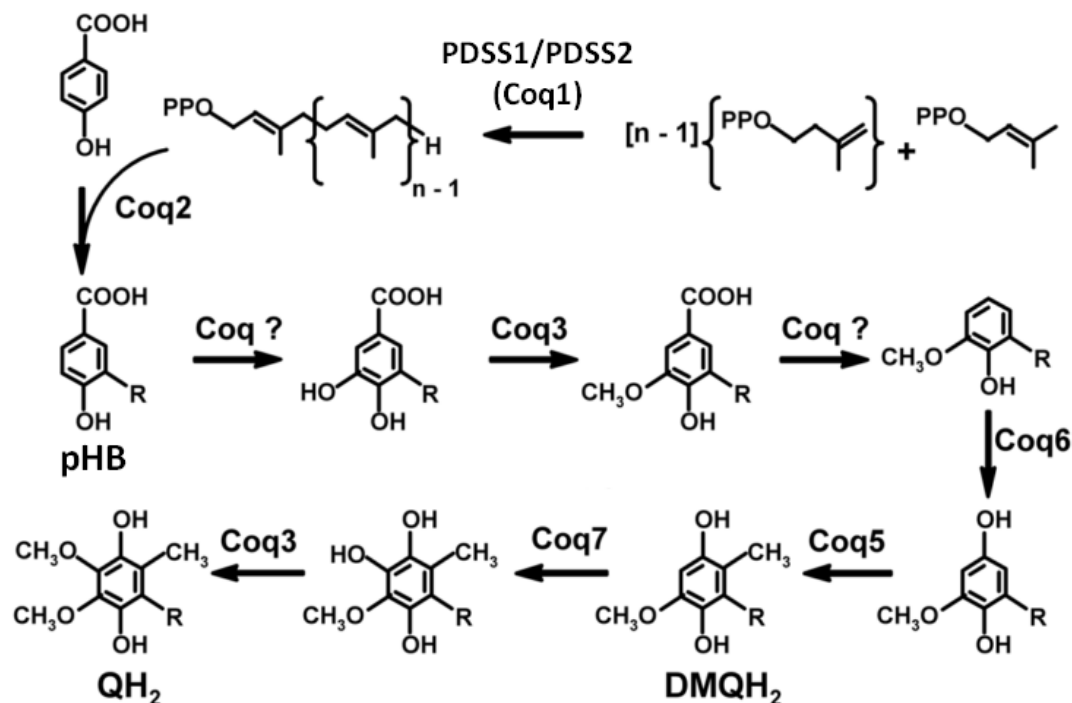


Figura 5. Ruta de biosíntesis del coenzima Q propuesta en eucariotas.

Tras la fusión del anillo bencénico y la cola isoprenoide por parte de la proteína Coq2, el anillo bencénico es hidroxilado por una proteína no identificada y posteriormente se le añade un grupo CH₃ tras una *O-metilación* llevada a cabo por Coq3p. Tras esto se produce una descarboxilación debido de nuevo a una enzima no determinada y Coq6p añade un grupo OH mediante una hidroxilación. Coq5p mediante una *C-metilación* añade un grupo CH₃ y posteriormente Coq7 añade un nuevo grupo OH mediante una hidroxilación. Finalmente vuelve a actuar la *O-metiltransferasa* Coq3 que añade un nuevo grupo CH₃ al anillo bencénico, generándose el coenzima Q.

Se especula con que Coq4p podría tener una actividad hidroxilasa o carboxilasa y que podría ser la enzima que cataliza alguno de los pasos de los que aún se desconoce la enzima que lo lleva a cabo (Tran & Clarke, 2007). La proteína Coq8/ADCK3 no tiene

una función conocida, pero se piensa que tenga un papel en principio regulatorio en la ruta de síntesis, ya que está descrita como una posible quinasa dentro de la familia ABC1 y cuenta con cuatro dominios quinasa conservados en su secuencia (Leonard, Aravind, & Koonin, 1998). Se ha observado por métodos indirectos que Coq8p tiene una actividad quinasa, ya que al sobreexpresar la proteína ortóloga humana *ADCK3* en levadura, se pueden detectar versiones de Coq3p, Coq5p y Coq7p fosforiladas que no aparecen en la estirpe nula de *COQ8*. También se ha observado que con la sobreexpresión de *ADCK3* se recuperan la capacidad de la estirpe nula en *COQ8* de crecer en medios con fuente de carbono no fermentable y también parcialmente el nivel de coenzima Q (Xie et al., 2011).

Coq9 es una proteína de función desconocida y que carece de homología con otras proteínas de función conocida, pero cuya mutación en levadura resulta en un fenotipo de deficiencia de coenzima Q (Tran & Clarke, 2007). Se ha observado que con la sobreexpresión de Coq8p en mutantes puntuales de *COQ9* se recupera parcialmente el coenzima Q, por lo que se sugiere una función más estructural que catalítica para Coq9p (Johnson et al. 2005).

2.2.1 Regulación de la biosíntesis del coenzima Q en eucariotas

La cantidad de coenzima Q es un parámetro que se encuentra regulado, de hecho podemos encontrar niveles variables entre tejidos según el requerimiento energético de éste. También se ha observado que el nivel de síntesis de coenzima Q puede verse alterado en patologías como el cáncer y la diabetes, asociado probablemente a un aumento de ROS (Guan et al., 1996).

El conocimiento de la regulación de la biosíntesis es muy limitado y se ciñe fundamentalmente al estudio en *Saccharomyces cerevisiae*. En levaduras el nivel de coenzima Q varía en función del medio de cultivo utilizado. El cultivo en medios con alto contenido en una fuente fermentable como la glucosa inhibe en un alto grado la biosíntesis del coenzima Q, mientras que el cultivo en una fuente de carbono no fermentable se incrementa de forma considerable (Gordon & Stewart, 1969). Se ha observado que al cultivar la levadura en un medio de cultivo con una fuente de

carbono no fermentable como el glicerol, los niveles de ARNm de *COQ3*, *COQ4*, *COQ5* y *COQ7* aumentaban (Belogradov et al., 2001; Clarke, Williams, & Teruya, 1991; Hagerman, Trotter, & Willis, 2002; B. N. Marbois & Clarke, 1996), así como aumentaba la cantidad de proteína Coq7 al cultivar las levaduras en un medio no fermentable como el etanol (Jonassen et al., 1998).

En levaduras existe la evidencia de la existencia de un complejo multienzimático para la biosíntesis del coenzima Q en el que participan la mayoría de las proteínas Coq que ha podido ser detectado mediante cromatografía de exclusión. Se ha observado que la forma nativa de Coq4p migra de forma conjunta a Coq3p, Coq6p y Coq7p formando un complejo de alto peso molecular indicando un posible papel de Coq4p como elemento estructural central en el complejo de biosíntesis (Jeong et al., 2006; B. Marbois et al., 2005; Tran et al., 2006).

Por otra parte, los mutantes nulos de *COQ3* a *COQ9* acumulan el precursor HHB (DHB en humanos) y no el sustrato inmediato de la reacción que catalizan (Barros et al., 2005; Johnson et al., 2005b; Poon, Do, Marbois, & Clarke, 1997; Poon, Marbois, Faull, & Clarke, 1995), aunque se ha encontrado que mutantes puntuales en *COQ7* (Sergio Padilla et al., 2004) y en *COQ5* (Barkovich et al., 1997) acumulan el sustrato inmediato a la reacción que catalizan.

El intermediario DMQ se acumula en mitocondrias de levaduras silvestres, aunque se ha observado que no sólo es incapaz de sustituir al coenzima Q en su función como transportador de electrones en la mitocondria, sino que actúa como un compuesto prooxidante y es incapaz de estabilizar al complejo *bc₁* mitocondrial (Do, Schultz, & Clarke, 1996). Se cree, por tanto, que esa acumulación de DMQ funciona a modo de reservorio para una rápida conversión a coenzima Q, por lo que se apunta a Coq7, la proteína que utiliza DMQ como sustrato, como un punto clave en la regulación del coenzima Q.

Otro elemento regulatorio en la biosíntesis del coenzima Q es la fosfatasa mitocondrial *PPTC7* tras demostrarse que defosforila a Coq7p *in vitro*, activando la síntesis de coenzima Q (González-Mariscal, 2011).

Los niveles de Coq3p, Coq4p, Coq6p, Coq7p y Coq9p están significativamente disminuidos en mitocondrias de otros mutantes nulos en genes *COQ* (Tran & Clarke,

2007), e incluso un mutante nulo en cualquiera de los genes *COQ*, conlleva a una disminución de la actividad *O-metil transferasa* de Coq3, aunque los niveles de ARNm de *COQ3* son normales (Hsu, Do, Lee, & Clarke, 2000). Todo esto lleva a la conclusión de que las proteínas Coq estarían actuando formando un complejo de biosíntesis y que el fallo en una de ellas conllevaría al fallo o desestabilización del complejo de biosíntesis.

2.3. El síndrome de deficiencia de coenzima Q

En el conjunto de enfermedades mitocondriales podemos encontrar un síndrome que se caracteriza por un déficit en la cantidad de coenzima Q, y es llamado síndrome de deficiencia de coenzima Q. En general, no está claro si la principal causa de la aparición del síndrome de deficiencia de coenzima Q es la afectación de la funcionalidad de la cadena de transporte mitocondrial o la afectación de sus otras funciones como antioxidante y/o papel en la síntesis de pirimidinas (Catarina M Quinzii & Hirano, 2010).

Las deficiencias de coenzima Q son genética y clínicamente heterogéneas y en la mayoría de los casos se desarrolla en la infancia o adolescencia. En la mayoría de los casos la historia familiar sugiere una herencia autosómica recesiva. Se pueden agrupar en deficiencias primarias, que se producen cuando una mutación afecta a un gen involucrado directamente en la ruta de biosíntesis del coenzima Q y en deficiencias secundarias, que se producen cuando la mutación no afecta a un gen involucrado en la ruta de biosíntesis del coenzima Q, pero que provoca un déficit de coenzima Q que acarrea la patología. Existe un tercer grupo en el que no está claro como se relacionan ocasionales reducciones en el nivel de coenzima Q con la enfermedad. La determinación de la deficiencia se establece mediante la medida de coenzima Q en músculo esquelético o fibroblastos en cultivo a partir de una biopsia muscular o de piel. La medida del coenzima Q a partir de muestras de sangre no es viable al verse afectado su nivel mediante la dieta (Montero et al., 2008).

A pesar de haberse descrito casos de pacientes con mutaciones en genes implicados en la ruta de síntesis del coenzima Q, el número de pacientes descritos es

aún bajo y la falta de correlación entre genotipo-fenotipo hace que el diagnóstico genético sea complicado y la solución sea la secuenciación de los genes en la búsqueda de la posible mutación.

Hasta la fecha se encuentran descritas mutaciones en genes que acarrearán una deficiencia primaria de coenzima Q en *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *ADCK3* y *COQ9*, mientras que se han descrito mutaciones en los genes *ETF*, *ETFDH*, *BRAF* y *aprataxina* (*APTX*) que acarrearán una deficiencia secundaria de coenzima Q. Mutaciones en *ETF* y *ETFDH* causan miopatía aislada, en *APTX* causan ataxia con apraxia oculomotora y en *BRAF* síndrome cardiofaciocutáneo, todos ellos con déficit de coenzima Q (Emmanuele et al., 2012). Es de esperar que la lista genes que provocan deficiencias primarias o secundarias aumenten en un futuro no muy lejano debido a la mayor atención que se está prestando a este tipo de patologías.

Dentro del síndrome de deficiencia de coenzima Q se han descrito cinco fenotipos mayoritarios:

- Encefalomiopatía con intolerancia al ejercicio, miopatía mitocondrial, mioglobinuria, convulsiones y ataxia (Ogasahara, Engel, Frens, & Mack, 1989). Fue la primera enfermedad descrita asociada al déficit de coenzima Q con la descripción de dos pacientes hermanas. Posteriormente se describieron algunos pacientes más, pero solo se encontró defecto genético en uno de ellos con una mutación en *ADCK3* (Auré et al., 2004).
- Variante infantil multisistémica incluyendo síndrome nefrótico, con encefalopatía, cardiomiopatía, ataxia, atrofia del nervio óptico, sordera (Rötig et al., 2000). Se describió por primera vez en tres hermanos donde no se determinó el origen genético. Es reconocible fundamentalmente por el síndrome nefrótico, que es poco habitual en el resto de fenotipos. Se han descrito varios pacientes dentro de este fenotipo con mutaciones en el gen *COQ2*, como por ejemplo dos hermanos con una delección en homocigosis que murieron al primer y duodécimo día de vida, y otros dos hermanos, uno de los cuales desarrolló síndrome nefrótico a los doce meses y el otro necesitó un trasplante de riñón a los tres años de vida, aunque mejoraron tras un tratamiento con coenzima Q (Diomedi-Camassei et al., 2007; Mollet et al.,

2007; Catarina Quinzii et al., 2006). También se han descrito mutaciones en *PDSS1* (Mollet et al., 2007), *COQ9* (Duncan et al., 2009) , *PDSS2* (López et al., 2006) y hasta 13 pacientes de 7 familias con mutaciones en *COQ6* (Heeringa et al., 2011).

- Variante predominantemente cerebelar con ataxia y atrofia cerebelar (Lamperti et al., 2003; Musumeci et al., 2001). La aparición de ataxia asociada al síndrome de deficiencia de coenzima Q es frecuente, aunque no está clara la causa de la aparición de ésta. Afecta mayoritariamente a niños o jóvenes y se ha detectado en pacientes con mutaciones en el gen *APTX* (C M Quinzii et al., 2005), una proteína involucrada en la reparación de roturas en el ADN. La relación entre *APTX* y la ruta de biosíntesis del coenzima Q es desconocida, pero mutaciones en *APTX* pueden provocar una deficiencia secundaria de coenzima Q. También se han descrito pacientes con mutaciones en *ADCK3* (R Horvath et al., 2012).
- Síndrome de Leigh con retraso del crecimiento, ataxia y sordera (Van Maldergem et al., 2002). Se ha descrito en dos hermanas en las que no se ha detectado un defecto genético. Este fenotipo se puede solapar con la variante cerebelar con ataxia.
- Fenotipo con miopatía aislada (R. Horvath et al., 2006; Lalani et al., 2005). Se ha descrito en pacientes con mutaciones en el gen *ETFDH*, que anteriormente se habían asociado a MADD, con miopatía con acumulación de lípidos y disfunción de la cadena respiratoria (Gempel et al., 2007). Posteriores publicaciones han descritos pacientes con MADD y mutaciones en *ETFDH*, pero con niveles normales de coenzima Q (Liang et al., 2009; Ohkuma et al., 2009).

2.3.1. Tratamiento del síndrome de deficiencia de coenzima Q

Como hemos comentado anteriormente, dentro de las enfermedades mitocondriales, este síndrome es el más fácilmente tratable. La deficiencia de coenzima Q en un paciente debe ser diagnosticada a partir de su medida en músculo o en fibroblastos. El tratamiento más inmediato es con coenzima Q vía oral, 10-30

mg/Kg/día en niños y 1000-3000 mg/día en adultos (Rita Horvath, 2012), aunque la respuesta al tratamiento es muy variable debido al diverso origen de la deficiencia. En la mayoría de los casos el tratamiento se ha realizado con la forma oxidada del coenzima Q (ubiquinona) que tiene una baja biodisponibilidad, pero desde hace poco se puede realizar el tratamiento con la forma reducida (ubiquinol) que parece tener una mayor biodisponibilidad y, por tanto, ser más efectiva.

Cuando se ha observado una mejoría más apreciable ha sido tras tratar a pacientes con mutaciones en *COQ2* y *COQ6*, sobre todo en los síntomas renales y neurológicos, mientras que la peor respuesta se ha observado en pacientes con mutaciones en *PDSS2* y un paciente con una mutación en *COQ9* (Rita Horvath, 2012). La mejoría ha sido muy importante en los pacientes con miopatía aislada (Gempel et al., 2007). En pacientes con el fenotipo encefalomiopático se ha observado una mejoría en los síntomas musculares, pero sólo algunos mejoraban los síntomas relacionados con el sistema nervioso, quizás debido a la dificultad que tiene el coenzima Q de atravesar la barrera hematoencefálica. Ha habido pacientes que han mostrado mejoría pero sólo temporalmente. Los resultados del tratamiento son más variables en los casos de una deficiencia secundaria de coenzima Q.

Se han descrito niveles deficientes de coenzima Q asociados a enfermedades como el Parkinson (Shults, 2005). En esta enfermedad y en otras neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la ataxia de Friedreich se produce daño oxidativo y disfunción mitocondrial, por lo que el uso de coenzima Q como antioxidante está tomando cada vez más relevancia (Beal, 2004).

También se ha asociado una disminución de la cantidad de coenzima Q al envejecimiento (Beyer et al., 1985; Kalén, Appelkvist, & Dallner, 1989) a la vez que aumenta la producción de ROS y el estrés oxidativo, por lo que se puede considerar adecuada una suplementación con coenzima Q al alcanzar la senectud.

3. El gen *ADCK2*, su posible relación con el coenzima Q y la patología

Hasta el día de hoy prácticamente no existe información ni publicaciones sobre el gen *ADCK2*, solamente estudios “*in silico*” del gen y la proteína que lo relacionan con la ruta de biosíntesis del coenzima Q. Únicamente se ha publicado muy recientemente que la disminución en la expresión de *ADCK2* y también de *PRKAR2B*, *TRPM7* y *TRIB2* parece afectar negativamente en la estimulación que la citoquina TNF α realiza sobre la actividad de HIF-1 α , un factor que juega un papel clave en la progresión de los tumores, al regular genes relacionados con la supervivencia, proliferación y metástasis de las células cancerosas (Schoolmeesters, Brown, & Fedorov, 2012). En principio, no tenemos elementos para relacionar este hecho con que el *ADCK2* pueda intervenir en la ruta de biosíntesis del coenzima Q.

3.1. *ADCK2* pertenece a la familia de quinasas atípicas ABC1

Se denomina quinoma al conjunto de proteínas quinasa o presuntas proteínas quinasa presentes en el genoma. El quinoma humano consta de 518 proteínas y la inmensa mayoría de ellas se agrupan en siete familias, TK, TKL, CAMK, CMCG, STE, CK1, AGC como se observa en la figura 6 (Manning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002). En los estudios “*in silico*” realizados sobre la secuencia de *ADCK2* y presentes en las bases de datos, se le ha asignado a la proteína una potencial función quinasa, aunque no ha sido demostrada, y se la ha incluido en el quinoma.

De las 518 proteínas presentes en el quinoma humano, 38 de ellas no se pueden incluir en ninguna de las siete familias mayoritarias al carecer o tener una homología en la secuencia muy baja con ellas. De esos 38 miembros, 5 de ellos se denominan *ADCK* y se agrupan dentro de una pequeña familia denominada ABC1. Uno de esos cinco miembros de la familia ABC1 es el *ADCK2*.

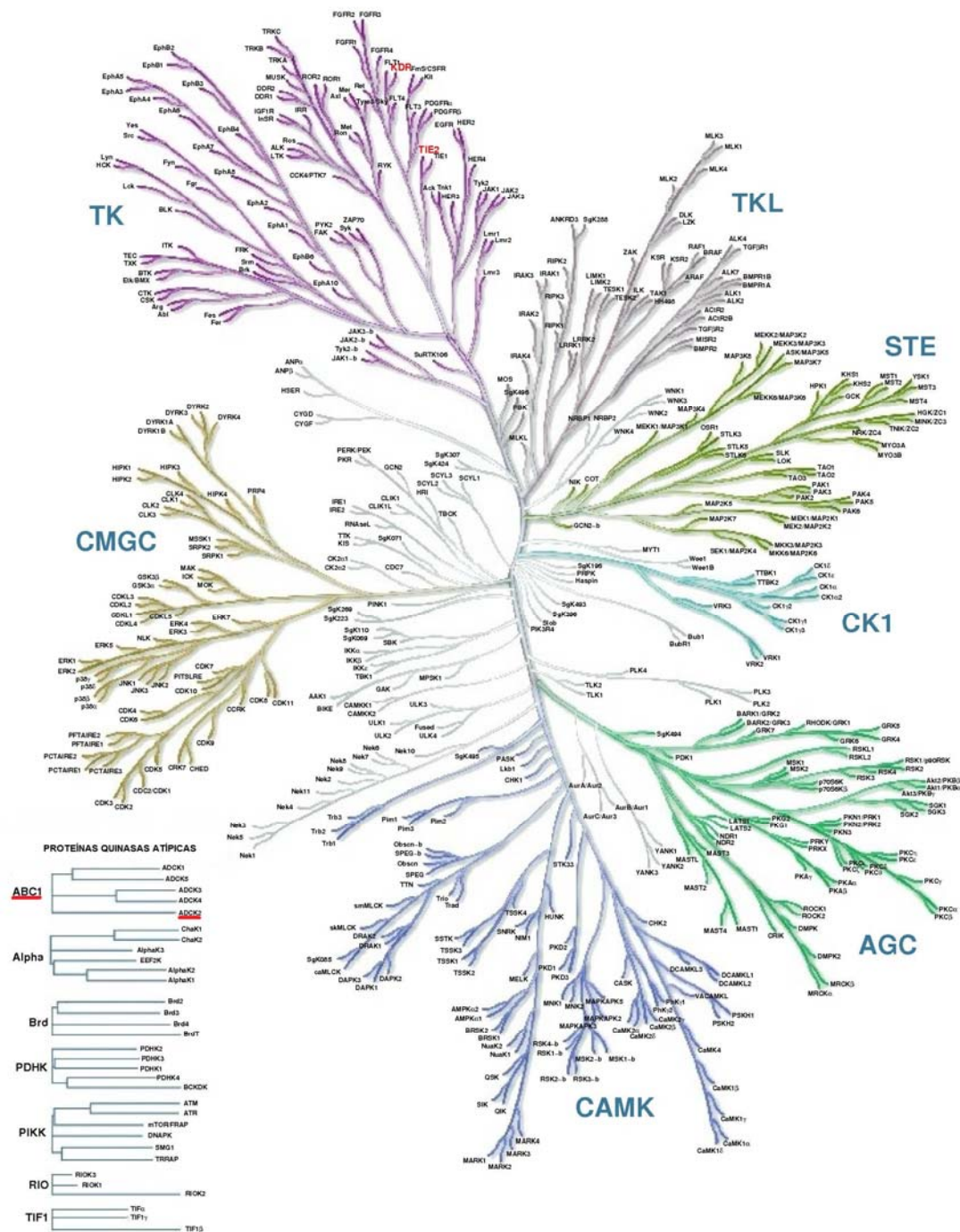


Figura 6. Mapa filogenético del quinoma humano. Se ilustra la similitud entre la secuencia de los dominios catalíticos de todas las presuntas proteínas quinasa, mostrándose más cercanas las proteínas con mayor similitud. El miembro ADCK2 pertenece a familia de quinasas atípicas ABC1. Tanto la familia ABC1 como ADCK2 se encuentran marcadas en rojo. Imagen modificada a partir de (Manning et al., 2002).

La historia de la nomenclatura de la familia ABC1 comenzó en 1991, cuando se publicó la existencia de un nuevo gen nuclear de levaduras designado como *ABC1* (del inglés Activity of bc₁ complex). Se concluyó que este gen era esencial para la transferencia de electrones en el complejo III, también llamado complejo *bc*₁, y que al sobreexpresarlo en multicopia suprimía el defecto causado por la mutación *cbs2-223* sobre la traducción del ARNm del citocromo *b* (un componente del complejo III de la cadena respiratoria). *Abc1p* portaba una señal de importación a la mitocondria, pero no se encontró una gran homología con ninguna otra proteína conocida. La inactivación de *ABC1* no era letal para las levaduras, pero las incapacitaba para crecer en un medio de cultivo con una fuente de carbono no fermentable y provocaba la ausencia de actividad I+III y II+III en estas levaduras, sugiriendo un problema en el complejo III o *bc*₁ de la cadena respiratoria. Se le asignó a *ABC1* una posible función como chaperona (Bousquet, Dujardin, & Slonimski, 1991).

Posteriormente en 1997 fue publicado que *ABC1* era esencial para la correcta conformación y funcionamiento del complejo *bc*₁ y también de los complejos II y IV. La delección de *ABC1* reducía la actividad del complejo *bc*₁, II y IV y además afectaba a la unión del coenzima Q con el complejo III. La adicción de coenzima Q exógeno compensaría parcialmente la deficiencia respiratoria, aunque la cantidad de coenzima Q del mutante y silvestre era la misma. Se afirmó que los complejos *bc*₁, II y IV eran termosensibles en la estirpe mutada, lo que sugería que habían sufrido cambios estructurales, por lo que se le asignó a *Abc1* una función de chaperona para la conformación y funcionamiento del complejo *bc*₁, y los efectos sobre los complejos II y IV serían debidos a la interacción de estos complejos con el complejo *bc*₁ defectuoso (Brasseur, Tron, Dujardin, Slonimski, & Brivet-Chevillotte, 1997).

Finalmente en 2001 fue publicado que el gen *ABC1* se correspondía con el gen *COQ8* de levaduras y que el mutante *ABC1/COQ8* en realidad era deficiente en coenzima Q, al contrario de lo indicado en 1997, y que acumulaban el precursor HHB. La suplementación con coenzima Q rescataría el fenotipo silvestre, pudiendo crecer la estirpe mutante en medios con una fuente de carbono no fermentable. También se rescataba parcialmente la actividad II+III de la cadena respiratoria. La termosensibilidad de los complejos indicada anteriormente en los mutantes

ABC1/COQ8 se atribuyó en este caso a la deficiencia de coenzima Q y a la deficiencia general provocada en la respiración, y no a un rasgo específico provocado por la carencia de *ABC1/COQ8*, indicándose que el déficit de coenzima Q es el rasgo principal encontrado en estos mutantes (Do, Hsu, Jonassen, Lee, & Clarke, 2001).

El gen de *Saccharomyces cerevisiae ABC1/COQ8* se corresponde, por homología, con el gen *ADCK3* en humanos, por lo que, tanto a *ADCK3* como a las otras cuatro proteínas ADCK que se relacionan por homología con *ADCK3* (*ADCK1*, *ADCK2*, *ADCK4* y *ADCK5*), se las agrupó en una familia que recibió el nombre original del gen en levaduras, la familia ABC1.

3.2. Generalidades del miembro *ADCK2*

El nombre del gen *ADCK2* es un acrónimo de proteína quinasa que contiene un dominio *aarF* (en inglés *aarF domain-containing protein kinase*), siendo el miembro número dos de la serie de los cinco miembros pertenecientes a la familia ABC1. El elemento común a los cinco miembros ADCK es que tienen una alta homología con el gen de bacterias *aarF*.

En 1998 se identificó y caracterizó el locus *aarF* en *E. coli* y *Providencia stuartii*. En *P. stuartii* se observó que los niveles de ARNm de la enzima AAC(2')-la disminuían drásticamente al deleccionar *aarF*. AAC(2')-la es una 2'-N-acetiltransferasa implicada en la O-acetilación de peptidoglicanos y que también es capaz de acetilar y desactivar ciertos aminoglucósidos. Sin embargo, también se observó que al deleccionar *aarF* se provocaba una deficiencia de coenzima Q. Esta deficiencia de coenzima Q también fue observada en *E. coli*, por lo que se le asignó a *aarF* una función en la biosíntesis del coenzima Q, además de cómo reguladora de genes (Macinga, Cook, Poole, & Rather, 1998).

La evidencia de que *aarF* está implicada en la biosíntesis de coenzima Q en bacterias y el hecho de que todos los ADCK presenten una alta homología con *aarF*, nos indica que todos los miembros de la familia ABC1 pueden estar implicados en la biosíntesis de coenzima Q (algo ya demostrado en *ADCK3/COQ8*), por lo que a todos

los ADCK, se le asigna una probable función en la biosíntesis del coenzima Q, incluido al ADCK2.

Como se puede observar en la figura 7, *ADCK2* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7 humano, concretamente en la región 7q34. El gen ocupa 21956 pb y consta de ocho exones. Codifica para una proteína de 626 aminoácidos a la que se le asigna un peso molecular estimado de 68,98 KDa.

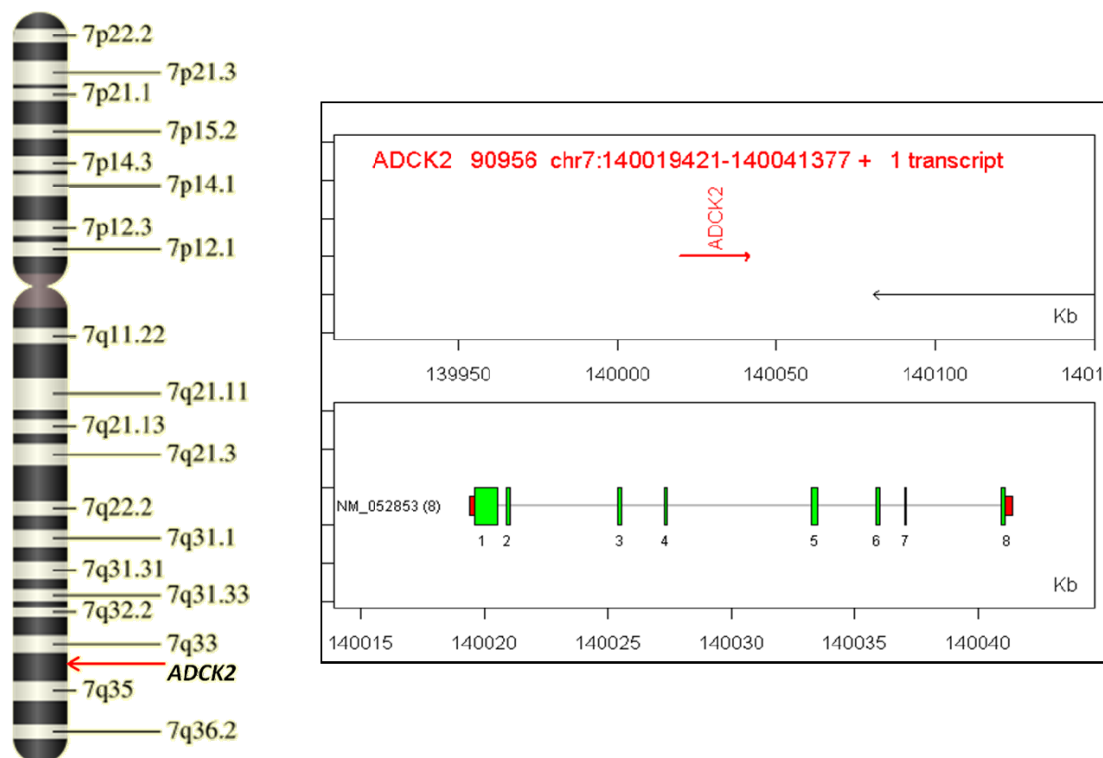


Figura 7. Localización del gen *ADCK2* en el ADNn. A la izquierda la localización de *ADCK2* en el brazo largo del cromosoma 7 humano. A la derecha ubicación de sus ocho exones dentro de la secuencia del gen.

3.3 Pacientes con mutaciones en el gen *ADCK2*

Como ya hemos apuntado, cada vez son más numerosos los casos descritos de deficiencia de coenzima Q y mayor el número de mutaciones y de genes identificados como los responsables de esa deficiencia. Tras someterse el paciente a la evaluación médica y llegar el personal clínico a la conclusión de que por los signos y síntomas presentes muy probablemente se trate de una enfermedad mitocondrial, actualmente, en diversos centros de investigación, de forma casi protocolaria, se realiza la

secuenciación génica en busca de mutaciones que pudieran ser el origen de la patología.

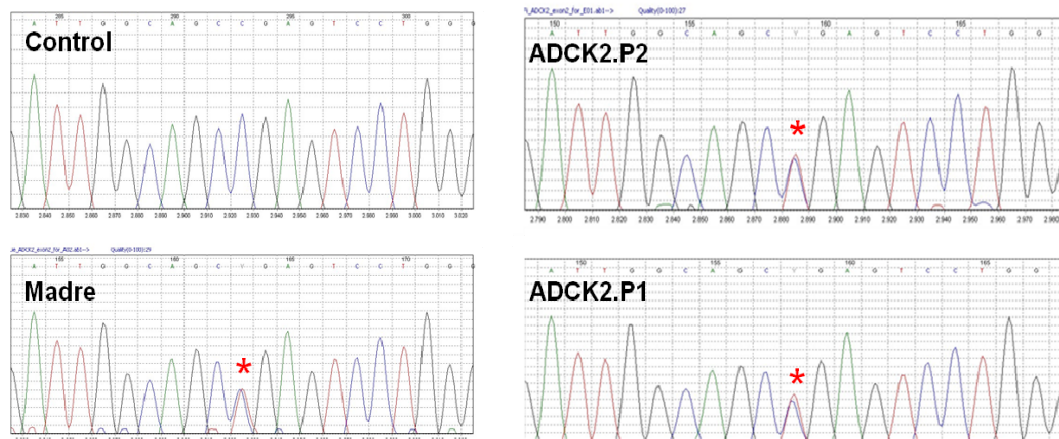
Gracias a la colaboración que realiza nuestro grupo con los grupos de investigación de la Dra. Orly Elpeleg del Centro Médico de la Universidad Hebrea (Israel) y la Dra. Sandra Jackson de la Clínica CG Carus (Alemania) hemos tenido constancia de la existencia de una serie de pacientes en los que se han detectado mutaciones en el gen *ADCK2*.

3.3.1. Determinación de la mutación en *ADCK2*

Ambos grupos recibieron los pacientes con mutaciones en *ADCK2* independientemente y de forma prácticamente simultánea en el tiempo. El grupo de la Dra. Jackson ha estudiado y tratado a un paciente perteneciente a una familia alemana, mientras que la Dra. Elpeleg lo ha hecho con dos hermanas pertenecientes a una familia de origen hebreo.

En el caso del paciente de origen alemán, a partir de ahora denominado *ADCK2-P2*, presentaba síntomas y signos que sugerían de forma probable la existencia de una enfermedad mitocondrial, por lo que se llevó a cabo la secuenciación de los genes implicados en la biosíntesis del coenzima Q y otros genes relacionados. Fueron secuenciados los genes *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ1*, *COQ2*, *COQ3*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ7*, *COQ9*, *COQ10A*, *COQ10B*, *ADCK1*, *ADCK2*, *ADCK3*, *ADCK4*, *ADCK5*, *PPTC7*, *ETFDH*, *ETFA* y *ETFB* encontrándose polimorfismos en la mayoría de ellos, pero sólo una mutación en el gen *ADCK2*. Dicha mutación consistía en un cambio en heterocigosis de una citosina por una timina en el exón dos, concretamente en la posición 997, lo que provocaba el cambio en la proteína de una arginina por un codón de stop en la posición 333 (Figura 8). La secuenciación del *ADCK2* también se realizó en los parientes cercanos del paciente, encontrándose la misma mutación en heterocigosis en la madre y en una hermana (denominada a partir de ahora *ADCK2-P1*), no encontrándose en una segunda hermana y no haberse podido determinar en el padre al haber fallecido.

A



B

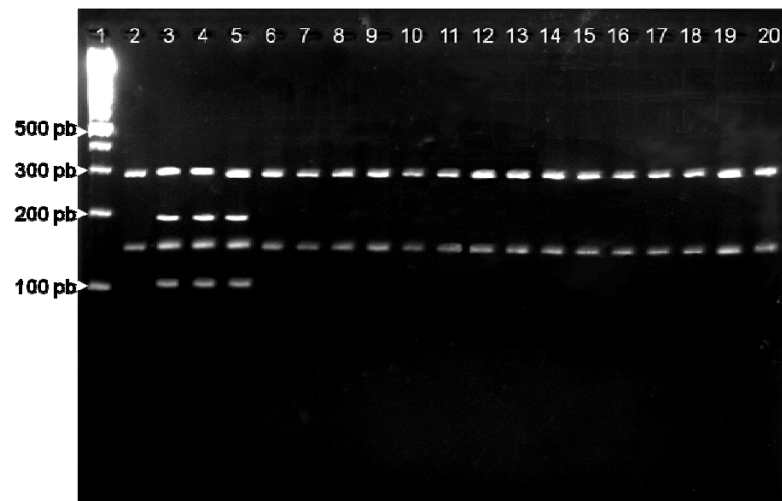


Figura 8. Determinación de la mutación en *ADCK2* en la familia de origen alemán. A) Secuenciación del gen *ADCK2* a partir de ADN obtenido de la sangre en el paciente ADCK2-P2, su hermana ADCK2-P1 y su madre frente a un control que fue repetido en 51 individuos diferentes. La mutación se señala con un asterisco rojo. **B)** Determinación de la mutación en *ADCK2* mediante restricción. Un fragmento de 437 pb de *ADCK2* que incluye la región donde se produce la mutación, se incubó con la enzima de restricción PvuI. En ausencia de la mutación se producen dos fragmentos de 294 pb y 193 pb, en presencia de la mutación se producen tres fragmentos de 189 pb, 143 pb y 105 pb. En la calle 1 se observan los marcadores, en la 2 la hermana sin la mutación, en la 3 ADCK2-P1, en la 4 ADCK2-P2, en la 5 la madre y en la 6-20 diversos controles.

En el caso de la familia israelí, las dos hermanas (la hermana mayor se denominará a partir de ahora ADCK2-P3) presentaban un único síntoma, una sordera congénita, por lo que la búsqueda de la causa genética fue algo más ardua ya que de forma aislada, la sordera, no se puede relacionar con la patología mitocondrial. En este

caso, primero se procedió a la búsqueda de las mutaciones más frecuentes en estos casos en la población judía de origen europeo (ashkenazi), dos mutaciones en el gen *GJB2* (deleción de la guanina 35 o de la timina 167) que codifica para la conexina 26 o una deleción de unas 340 kpb en el exón 1 del gen *GJB6*, que codifica para la conexina 30 (Lerer et al., 2000). No se encontraron mutaciones en ninguno de los dos genes y tampoco en otros como *Clarin-1*, *Pendrina* o *PCDH15*. Al no encontrarse mutaciones en los genes *a priori* candidatos, se procedió a la búsqueda de regiones homocigotas comunes a las dos hermanas afectadas, pero no a sus otras hermanas sanas; sin embargo debido a la alta cantidad de exones presentes en las regiones homocigotas, se optó por la secuenciación del exoma completo. Tras esto se observaron mutaciones en cuatro genes, *WDR72*, *PALLD*, *GLI2* y *ADCK2*. Las mutaciones se sometieron a los programas informáticos Polyphen, SHIFT y Mutation taster para determinar su potencial patogenicidad, siendo la mutación en *ADCK2* la única considerada como patogénica. La mutación consistía en un cambio en homocigosis de una citosina por una timina en la posición 1817, que en la proteína provocaba el cambio de una prolina por una leucina en la posición 606.

3.3.2. Historial familiar de los pacientes con mutaciones en *ADCK2*

El historial familiar de la familia de origen alemán es algo complejo. Además de en el paciente *ADCK2*-P2 (50 años), la misma mutación se ha encontrado, también en heterocigosis, en su madre y en una de las hermanas (*ADCK2*-P1), aunque ambas no presentan, a día de hoy, signos patológicos relacionados con la mutación y se consideran personas sanas. Sin embargo, la madre (84 años) es depresiva y con tendencias suicidas y la hermana que también porta la mutación parece tener desórdenes de la personalidad. Hay una segunda hermana que no porta la mutación, pero que es hija de un padre distinto. Esta hermana incluso afirma que los otros dos hermanos que portan la mutación son hijos de padres diferentes, extremo que no ha podido ser confirmado y que complica el estudio de la mutación. El supuesto padre de ambos hermanos que portan la mutación falleció de causas no determinadas.

El historial familiar de la familia de origen hebreo parece estar mucho más clara. Se trata de una pareja sana de primos segundos que portan la mutación en heterocigosis y de sus cinco hijas. De las cinco hijas, son la segunda (denominada ADCK2-P3, 7 años) y la tercera (5 años) las que presentan la patología, mientras que la primera (10 años) y la cuarta (4 años) portan la mutación en heterocigosis y la quinta (1 año) no porta la mutación. El pedigrí de ambas familias se observa en la figura 9.

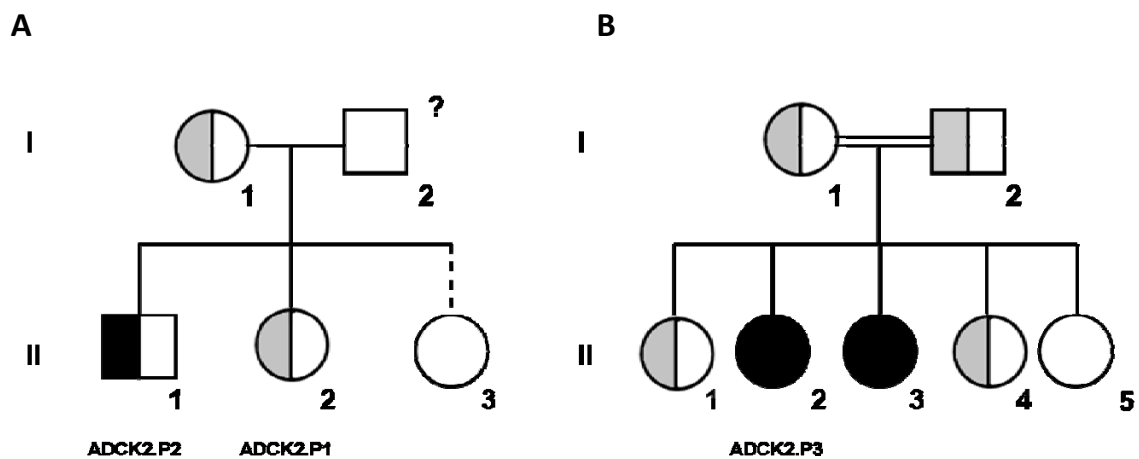


Figura 9. Pedigrí de las familias con mutaciones en *ADCK2*. **A)** Pedigrí perteneciente a la familia de origen alemán. **B)** Pedigrí perteneciente a la familia de origen Israelita. Cuando el gen se encuentra en homocigosis se representa con un solo color, mientras que si se encuentra en heterocigosis se representa con dos colores. En negro o parcialmente en negro aparecen los individuos afectados por la patología, en blanco los individuos sanos y no portadores de la mutación o en los que no se ha podido determinar, y parcialmente en gris los individuos que portan la mutación, pero que, en principio, no presentan signos patológicos asociados a ella. La doble línea representa pareja consanguínea y la línea discontinua que uno de los padres es distinto a sus hermanos. El signo de interrogación significa individuo del que se desconoce si porta la mutación.

3.3.2. Cuadro clínico de los pacientes con mutaciones en *ADCK2*

Respecto al cuadro clínico de los pacientes descritos anteriormente, es el paciente ADCK2-P2 el que presenta una sintomatología que nos indica la probable presencia de una patología mitocondrial. Se trata de un varón de 50 años que durante la infancia desarrolló una patología renal que cesó espontáneamente a la edad de 13 años. A los 25 años desarrolló una lenta y progresiva debilidad muscular proximal con mialgias (dolor muscular) permanente, tanto durante el ejercicio muscular como durante el reposo. Tras 20 años, el paciente solo puede recorrer una distancia máxima

de 100 metros, se encuentra en una silla de ruedas y requiere de opiáceos para el alivio de las mialgias. Además de los problemas musculares el paciente presenta disfunción hepática e hipertrofia ventricular izquierda. No se ha detectado ataxia y la función cognitiva es normal.

En cuanto a los marcadores clínicos, lo que más destaca en ADCK2-P2 es la alta concentración de lactato medida en sangre (6.6mM, valor normal <5mM) y también en el cerebro, detectado mediante resonancia magnética nuclear. También resulta muy llamativa el alto nivel detectado de la enzima creatina quinasa (14, valor normal <3.2), un claro marcador de destrucción muscular. Otros marcadores detectados con valores anormales fueron las enzimas hepáticas HFF (1.8, valor normal >3.6), LDH (7.9, valor normal <3.8), ALAT (1.6, valor normal <0.8), ASAT (2.0, valor normal <0.8), GGT (1.9, valor normal <0.8), GLDH (2.5, valor normal <0.1).

En el paciente se detectó también en sangre un alto nivel de acil-carnitinas de todos los tamaños, cadena corta, cadena media y cadena larga (de dos carbonos a dieciséis carbonos), así como una acusada reducción de la carnitina libre, pero un nivel normal de carnitina total. Esto sugeriría un mal funcionamiento del metabolismo de los ácidos grasos en el paciente, en el que los ácidos grasos se unen correctamente a la carnitina, pero una vez unidos no eran degradados correctamente mediante el ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos. Las acil-carnitinas son el sustrato de la enzima CPT-II (como se observa en la figura 10) para dar lugar a la carnitina libre, que se recicla, y el acil-CoA, en una reacción que es reversible, por lo que un problema que afecte a cualquier paso de la β -oxidación puede provocar la acumulación de acil-CoA y que la CPT-II actúe en sentido contrario, acumulándose acil-carnitinas.

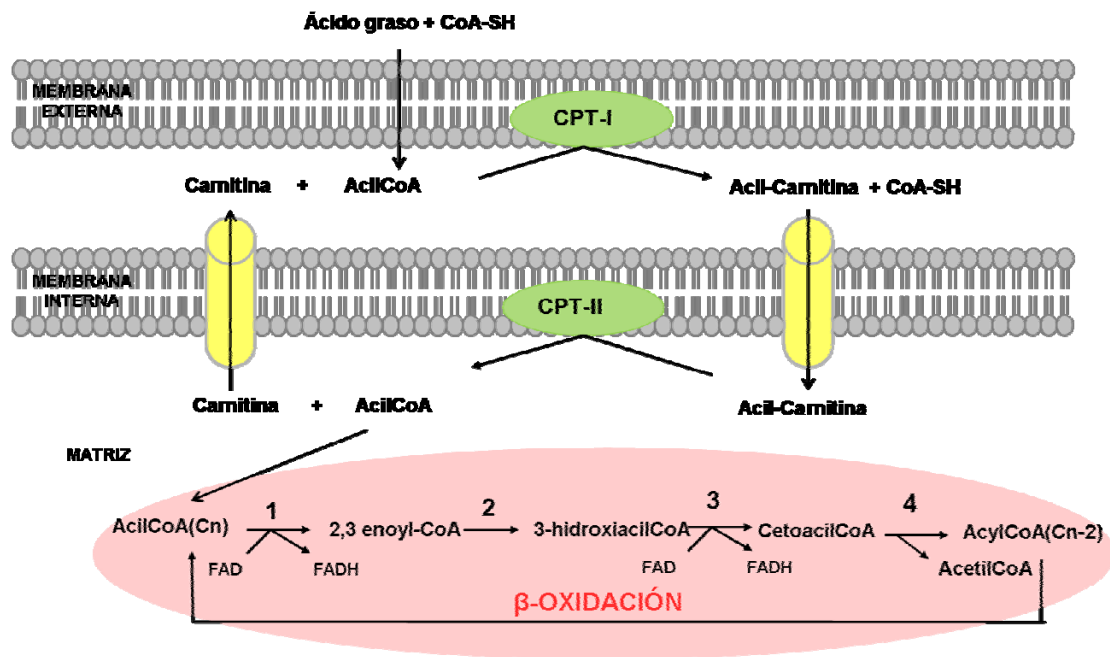


Figura 10. Transporte a la mitocondria y degradación en el ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos. El ácido graso es activado por una molécula de CoA y posteriormente transportado a la matriz mitocondrial, para ser degradado en el ciclo de la β -oxidación, tras unirse en el espacio intermembrana a una molécula de carnitina.

Adicionalmente se realizó al paciente una biopsia muscular para el estudio de dicho tejido (figura 11). Se observó una considerable acumulación de gotas lipídicas en el músculo, evidencia que se relaciona con el hecho que hemos comentado anteriormente sobre la acumulación de acil-carnitinas en la sangre y una defectuosa degradación de los ácidos grasos. También se observaron cambios miopáticos (fragilidad y destrucción muscular) con múltiples fibras musculares afectadas. En menor proporción se observaron fibras rasgadas rojas y fibras rasgadas azules, que se tratan de fibras musculares donde ha habido una acumulación anormal de mitocondrias, tanto en número como en volumen, en la periferia provocando una forma irregular de la fibra muscular (Reichmann, Vogler, & Seibel, 1996). Todo en conjunto estaría mostrando la grave afectación del tejido muscular que padece el paciente ADCK2-P2.

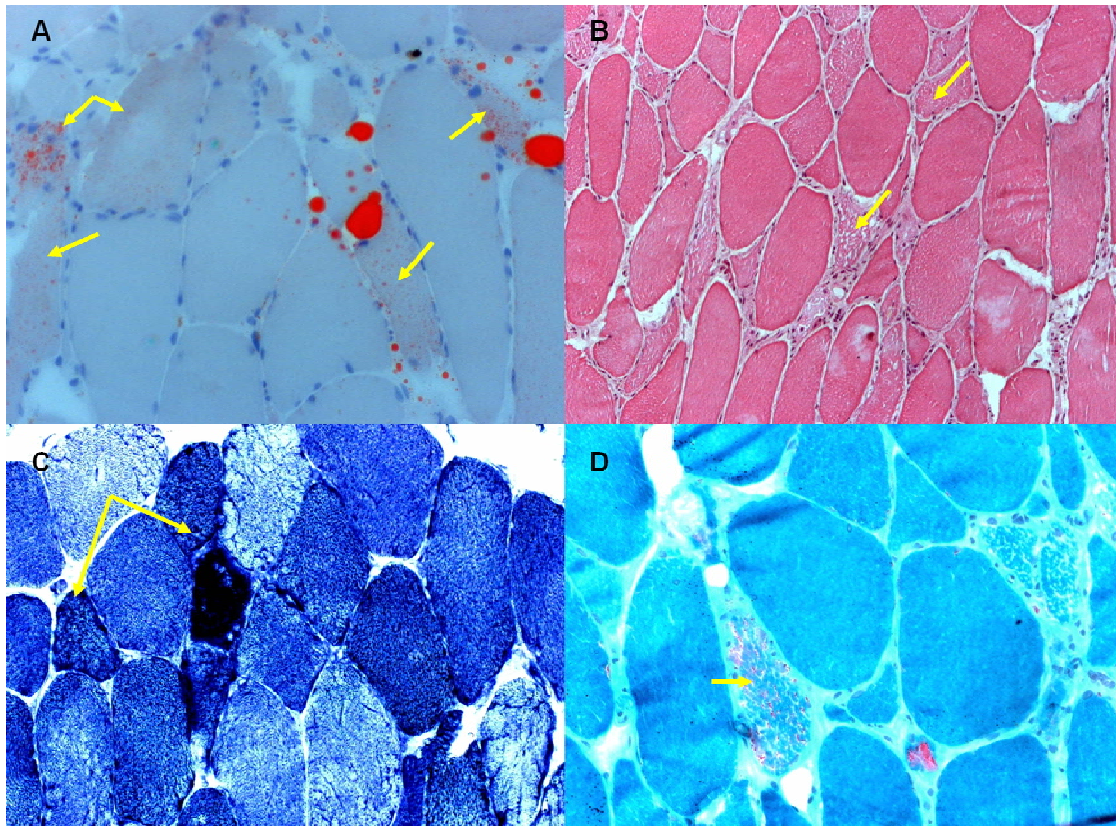


Figura 11. Histología muscular del paciente ADCK2-P2. A) Tinción rojo aceite con la que se muestran gotas lipídicas. B) Corte histológico donde se observan cambios miopáticos en numerosas fibras. C) Tinción sobre la succinato deshidrogenasa donde se muestran algunas fibras azules rasgadas. D) Tinción con tricromo de Gomori mostrando alguna fibra rojo rasgada. Todas las imágenes están a un aumento X20.

El cuadro clínico del paciente ADCK2-P3 es mucho más simple, ya que únicamente presenta como síntoma pérdida auditiva, al igual que su hermana menor. La pérdida auditiva congénita es el más común de los defectos sensitivos y afecta a 1:2000 nacimientos (Mehl & Thomson, 2002). En la mitad de los casos la pérdida auditiva es del tipo sensorineural, y en un 70% de esos casos es una pérdida auditiva sensorineural no sindrómica (NSHL), es decir, la sordera no se ve acompañada por otros síntomas (Nance, 2003). En la gran mayoría de los casos de NSHL la transmisión del defecto se realiza de forma autosómica recesiva, algo que parece muy probable al observar la figura 9 del pedigrí de la familia del paciente ADCK2-P3. Los padres del paciente ADCK2-P3 detectaron que no oía correctamente a los 9 meses de edad. Se le realizó una otoscopia y una timpanografía y fueron normales y tras provocar emisiones otoacústicas transitoriamente (TE-OAE), se detectó una emisión parcial en el oído izquierdo. Las emisiones otoacústicas son débiles sonidos generados por el tímpano en

respuesta a vibraciones interiores de la cóclea, una cóclea sana genera sonidos, mientras que una lesionada no lo hace. Sin embargo al realizar el test BAER, que es un test que se utiliza para detectar la actividad eléctrica de la cóclea, no se generó onda-V en respuesta a estímulo tonal en ninguno de los oídos. Este hecho unido a las pruebas de comportamiento apoyó el diagnóstico de una profunda pérdida auditiva en el paciente ADCK2-P3, así como en su hermana pequeña.

3.3.2. Tratamiento de los pacientes con mutaciones en *ADCK2*

El tratamiento al que se han sometido los pacientes con mutaciones en *ADCK2* ha tenido resultados dispares. En el caso del paciente ADCK2-P2 el tratamiento ha tenido un éxito parcial. El paciente se sometió a un tratamiento de 200 mg de coenzima Q/día que provocó una reducción del pico de lactato detectado mediante resonancia magnética del cerebro. La dosis es aun baja y deberá ser aumentada en un futuro.

En un intento de mejorar el metabolismo de los ácidos grasos el paciente fue tratado durante 3 años con biocarnitina (4 g/día), pero no hubo mejora de los síntomas. Esto indica que el problema en el metabolismo de los ácidos grasos probablemente no se encuentre a nivel del transporte de los ácidos grasos con carnitina, sino a otro nivel en la β -oxidación de los ácidos grasos. Al paciente se le trató también con riboflavina (200 mg/día), provocando una mejora en todos los niveles de acil-carnitinas en sangre (Figura 12), pero solo parcial, ya que la concentración de acil-carnitinas en sangre continuaba siendo elevada.

Los síntomas musculares del paciente ADCK2-P2 permanecieron sin mejoría en todos los tratamientos realizados y actualmente se encuentra en una silla de ruedas.

Concentración de acil-carnitinas tras el tratamiento con riboflavina

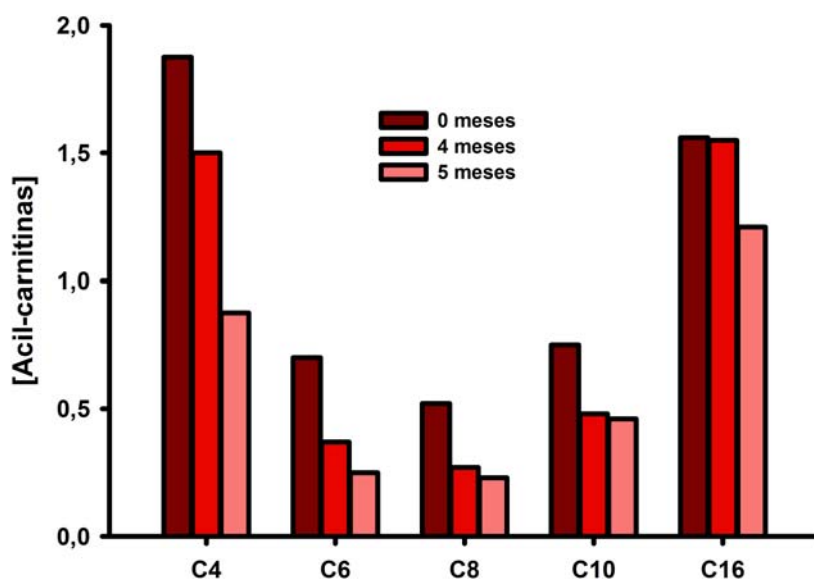


Figura 12. Perfil de acil-carnitinas en sangre encontrados en ADCK2-P2 tras someterse al tratamiento con riboflavina. La cantidad de acil-carnitinas en sangre se midieron a los 4 y 5 meses de tratamiento. Se midieron las acil-carnitinas de 4, 6, 8, 10 y 16 carbonos.

En el paciente ADCK2-P3 se introdujeron implantes cocleares a las edades de 11 meses y 3.5 años, recuperando el retraso en el desarrollo del lenguaje que padecía. El mismo procedimiento se llevó a cabo en la hermana pequeña, también afectada, con el mismo resultado satisfactorio. Actualmente la resonancia magnética nuclear del cerebro es normal y las pacientes tienen un desarrollo psicomotor también normal. En el examen físico de ambas hermanas no se encontró ninguna anomalía, excepto por una ligera hipotonía en la hermana pequeña.

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo global de este trabajo es determinar la relación existente entre la proteína codificada por el gen humano *ADCK2* y la ruta de síntesis del coenzima Q.

Este objetivo se abordó mediante una serie de objetivos secundarios que se indican a continuación:

1. Caracterizar fenotípicamente los fibroblastos provenientes de pacientes con mutaciones en el gen *ADCK2*.
2. Demostrar la participación de *ADCK2* en la síntesis de coenzima Q mediante métodos de sobreexpresión y silenciamiento en células humanas y mediante complementación funcional en levadura.
3. Determinar el perfil de expresión de *ADCK2* y su localización subcelular.
4. Desvelar la función bioquímica de *ADCK2* en relación a la síntesis de coenzima Q.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis fenotípico de fibroblastos provenientes de pacientes con mutaciones en el gen *ADCK2*

Cada vez son más los casos conocidos de patología asociada a la deficiencia de CoQ₁₀. En algunos de estos casos, se han podido relacionar, tanto la deficiencia de CoQ₁₀ como la patología, a mutaciones en determinados genes. Como hemos comentado en el apartado anterior cuando las mutaciones ocurren en genes implicados en la ruta de biosíntesis del CoQ₁₀ las deficiencias de coenzima Q son llamadas deficiencias primarias, mientras que si ocurren en genes no implicados en la ruta de síntesis del CoQ₁₀, pero que la mutación acarrea un déficit del mismo, son llamadas deficiencias secundarias (C Quinzii & Hirano, 2012). Hasta el momento se han descritos casos de pacientes con deficiencia primaria por mutaciones en los genes *PDSS1/PDSS2*, *COQ2*, *COQ6*, *COQ8/ADCK3* y *COQ9*; mientras que ejemplos de deficiencia secundaria son los casos de mutaciones en los genes *ETFDH*, *APTX* o *BRAF* (Emmanuele et al., 2012). Recientemente también se ha descrito un paciente con una delección en *COQ4* (Salviati et al., 2012).

Gracias a la colaboración de nuestro grupo con los grupos de la Dra. Sandra Jackson y la Dra. Orly Elpeleg, pudimos acceder a muestras biológicas de tres individuos pertenecientes a dos familias distintas, dos de los cuales presentan características clínicas propias del síndrome de deficiencia de CoQ₁₀, como se ha descrito anteriormente en la introducción. En los tres casos se detectaron mutaciones en el gen *ADCK2*; dos de ellos, hermanos, presentaban un codón de stop prematuro en la misma posición en heterocigosis (*ADCK2*-P1 y P2), mientras que el tercero, de una familia distinta, presentaba una mutación puntual en homocigosis (*ADCK2*-P3).

Para el estudio de estos tres casos de pacientes con mutaciones en *ADCK2* se recurrió al análisis de fibroblastos derivados de una biopsia de piel. Adicionalmente, también se procedió al estudio de fibroblastos derivados de un paciente con dos mutaciones en heterocigosis en el gen *ETFDH* descrita anteriormente (Gempel et al., 2007; R. Horvath et al., 2006). Este paciente se trata de una mujer de 40 años sin historial familiar de enfermedad neuromuscular y que padece el fenotipo de déficit de coenzima Q con miopatía aislada. Padece diabetes de tipo I desde los 14 años y una leve hipertensión arterial. A los 32 años, durante su tercera semana de embarazo,

empezó a notar dificultad para subir escaleras, la debilidad prosiguió y tras el parto no fue capaz de cuidar de su bebé. En la exploración clínica se observó debilidad proximal de las extremidades superiores e inferiores y falta de reflejos, mientras que la electromiografía mostró cambios miopáticos en músculos proximales. En el análisis sanguíneo se detectó elevada la creatina quinasa, que se elevó aun más tras un tratamiento con carnitina y un nivel de lactato ligeramente elevado. Tras seis meses de tratamiento con 500 mg/día de CoQ10 la paciente tuvo una recuperación de los síntomas casi total.

Con los fibroblastos del paciente con mutaciones en el *ETFDH* pudimos realizar un estudio comparativo de fibroblastos con una deficiencia secundaria de coenzima Q y fibroblastos de pacientes con mutaciones en *ADCK2*.

1.1. Contenido de CoQ₁₀ en fibroblastos

Los pacientes presentaron un cuadro clínico que encajaba con una enfermedad mitocondrial como el síndrome de deficiencia de coenzima Q, sin embargo no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes de la ruta de síntesis del coenzima Q, pero si en el gen *ADCK2*. Hasta ahora el gen *ADCK2* únicamente se había relacionado “*in silico*” con la ruta de biosíntesis del CoQ₁₀, sugiriendo un papel de *ADCK2* en dicha ruta, por lo que el primer análisis obligado que debimos realizar a los fibroblastos derivados de estos pacientes fue determinar su contenido total de CoQ₁₀.

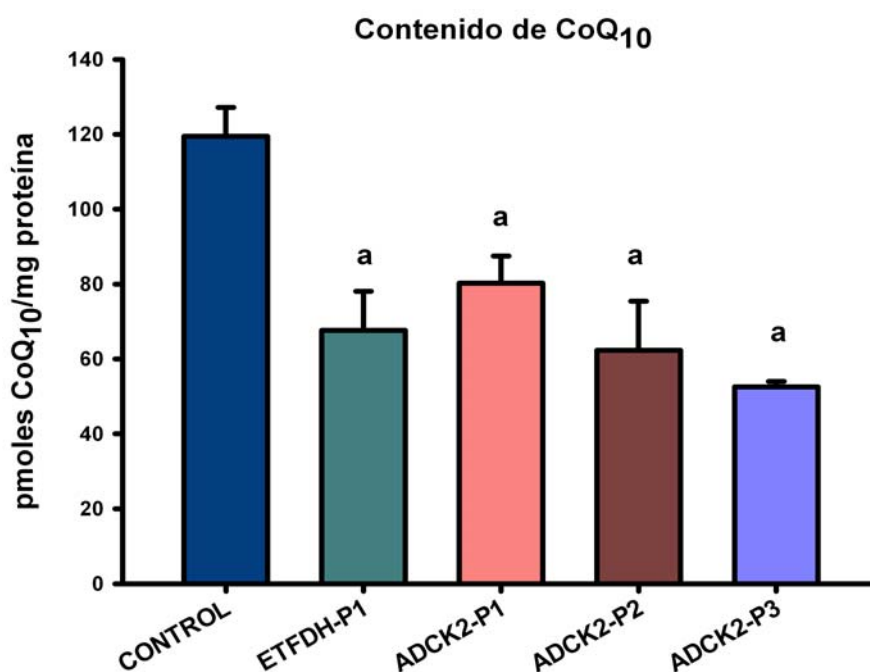


Figura 13. Contenido de CoQ₁₀ en los fibroblastos de pacientes. La cantidad de CoQ₁₀ se determinó a partir de un homogenado de células tras un mínimo de 72 horas de cultivo. Tras extraer los compuestos lipídicos, éstos se separaron mediante HPLC-ECD. La determinación de los niveles de CoQ₁₀ se realizó a todos los fibroblastos de pacientes, usando fibroblastos de piel de humano adulto (HDF) como control. a=P<0.05

El contenido de CoQ₁₀ en fibroblastos de todos los pacientes (Figura 13) se encontró disminuido respecto al control entre un 33% en el caso de ADCK2-P1, y un 56% en el caso de ADCK2-P3. El paciente con deficiencia secundaria ETFDH-P1 tiene una disminución intermedia del 43%.

Con la constatación de que los fibroblastos de todos los pacientes con mutaciones en *ADCK2* tienen a su vez un déficit de CoQ₁₀ tenemos la primera evidencia de que *ADCK2* está relacionado con la síntesis de CoQ₁₀. Con este dato podemos concluir que mutaciones en *ADCK2* provocan un déficit en la cantidad de CoQ₁₀, pero no podemos especificar si se trata de una deficiencia primaria o secundaria como el caso de ETFDH-P1. Las mutaciones en *ADCK2* provocarían un déficit de CoQ₁₀ que traerían consigo el cuadro patológico a los pacientes ADCK2-P2 y ADCK2-P3. Se da la circunstancia de que el individuo ADCK2-P1 es, hasta el día de hoy, fenotípicamente normal sin ningún signo o síntoma patológico. Precisamente los fibroblastos ADCK2-P1 son los que tienen un déficit menos acusado de CoQ₁₀. Es posible que el paciente ADCK2-P1 pudiera tener un cuadro clínico similar a su hermano ADCK2-P2, con la misma mutación, pero que al tener una cantidad de CoQ₁₀ ligeramente superior a éste no desarrolle la patología. Además del control utilizado en este estudio, se ha establecido un rango de concentración de CoQ₁₀ considerado como normal en fibroblastos de 107-145 pmolesCoQ₁₀/mg proteína (Montero et al., 2008), por lo que la deficiencia de ADCK2-P1 no es excesivamente acusada si tomamos 107 pmolesCoQ₁₀/mg proteína como valor normal. Es posible que aun mostrando los fibroblastos de ADCK2-P1 una deficiencia de CoQ₁₀, por mecanismos compensatorios desconocidos (sistemas de regulación, epigenética e incluso factores ambientales) el paciente no muestre la patología desarrollada en el paciente ADCK2-P2. Podríamos establecer que el paciente ADCK2-P1 posee un nivel umbral “personal” que estaría por debajo de los 107 pmolesCoQ₁₀/mg evitando de ese modo la manifestación de la patología. La carencia de signos patológicos en el individuo ADCK2-P1 se podría explicar de manera análoga a como un individuo con cierto nivel de colesterol en sangre puede desarrollar una patología a lo largo de su vida, mientras que otro individuo con el mismo nivel de colesterol en sangre puede no desarrollarla debido a otros factores epigenéticos y/o ambientales. De todas formas, no podemos descartar que ADCK2-P1 pueda desarrollar algún tipo de patología a lo largo de su vida.

1.2. Tasa de síntesis de CoQ₁₀ por incorporación de [¹⁴C]pHB

Además de cuantificar los niveles totales de CoQ₁₀ en los fibroblastos, era interesante determinar la tasa de síntesis del CoQ₁₀. Para esto se incubaron las células con el primer precursor estable de la ruta de síntesis del CoQ₁₀, el pHB. Este precursor se encontraba radiomarcado con ¹⁴C, por lo que se pudo hacer un seguimiento en la síntesis de CoQ₁₀, detectando CoQ₁₀ radiomarcado con ¹⁴C tras 48 horas de incubación como se explica en el punto 6.8 de Materiales y Métodos.

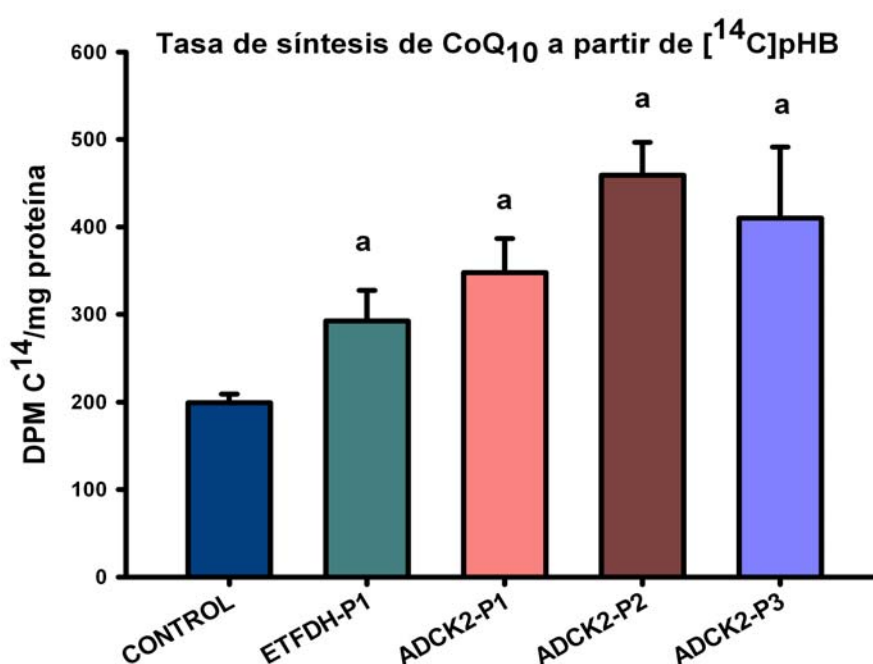


Figura 14. Medida de la tasa de síntesis de CoQ₁₀ a partir de su precursor [¹⁴C]pHB. A partir de un frasco de 175cm² a un 80% de confluencia se incubó con [¹⁴C]pHB durante 48 horas, tras las cuales se recogieron las células, se extrajeron los lípidos, se aisló el CoQ₁₀ por TLC y finalmente se cuantificaron las DPM de [¹⁴C]CoQ₁₀, usando células HDF de adulto como control, en el contador de centelleo. a=P<0.05

En todos los casos se observó un aumento en la tasa de síntesis del CoQ₁₀, variando de un aumento del 46% en el caso de ETFDH-P1 al 130% en el caso de ADCK2-P2. En principio cabría esperar que unas células con deficiencia de CoQ₁₀ deberían tener a su vez, también, una menor tasa de síntesis, aunque esto puede no ser así por dos motivos.

Por un lado, el coenzima Q es bastante estable, la vida media del CoQ₉ en ratón, por ejemplo, varía entre las 50 horas en tejido muscular y las 125 horas en tejido de riñón (Theiin, Schedin, & Dallner, 1992). Por tanto, en unas células control, la tasa de renovación en 48 horas la debemos considerar baja respecto a la cantidad de CoQ₁₀ total; de hecho las células control sintetizan 200 DPM [¹⁴C]CoQ₁₀/mg proteína, que se corresponden con 3.21 pmoles de [¹⁴C]CoQ₁₀/mg proteína. Es decir, en 48 horas se ha podido sintetizar un 2.7% de los 119 pmoles CoQ₁₀/mg proteína totales de las células control. También hay que añadir, para explicar este bajo % de renovación, la existencia de una síntesis endógena en la célula que, aunque minoritaria, se realiza a partir de un pHB más disponible para la célula al encontrarse ya en su interior, por lo que la tasa de síntesis observada con este método se encuentra parcialmente infravalorada. En definitiva, aunque se observe un aumento relativo de más del doble en la tasa de síntesis del CoQ₁₀ como en el caso de ADCK2-P2, este incremento no conlleva a un aumento significativo de la cantidad de CoQ₁₀ absoluta, pudiéndose explicar así que células que tengan una mayor tasa de síntesis de CoQ₁₀ que las células control, tengan a su vez una deficiencia de CoQ₁₀.

Por otro lado, quizás aun más importante, hay que tener en cuenta que en este experimento las células se encuentran en condiciones saturantes del precursor pHB, por lo tanto se está generando una situación favorable a la síntesis de CoQ₁₀. En condiciones fisiológicas esa tasa de síntesis debe ser menor. Aun así, es lógico que en condiciones de saturación del precursor, las células con déficit de CoQ₁₀ tengan una mayor tasa de síntesis, ya que tienen un mayor requerimiento de éste. Solamente hay descritos unos casos en los que aun teniendo un déficit de CoQ₁₀ y, por tanto, necesidad de éste; la tasa de síntesis disminuye respecto del control. Son los casos de células con deficiencia de CoQ₁₀ en las que la maquinaria de síntesis esté directamente afectada, es decir, en los casos de deficiencia primaria de CoQ₁₀. Esto es lo que sucede en células deficientes en CoQ₁₀ y con una mutación en el gen *COQ2*, donde se observa una disminución aproximada del 50% en la incorporación de [¹⁴C]pHB (López-Martín et al., 2007). También ocurre en células con una delección en *COQ4*, donde la incorporación de [¹⁴C]pHB es solo un 43 % del control (Salviati et al., 2012).

Podemos concluir, por tanto, que mutaciones en ciertos genes que provocan un déficit de CoQ₁₀, provocan a su vez un aumento en la tasa de síntesis de CoQ₁₀ a partir de pHB en condiciones saturantes, debido al mayor requerimiento de CoQ₁₀ en estas células. Este sería el caso de células con mutaciones en *ADCK2*, y también en *ETFDH*. Sin embargo, esto no es así en el caso de que las mutaciones afecten a genes implicados directamente en la ruta de síntesis del CoQ₁₀, como serían los casos de *COQ2* y *COQ4*.

Si los niveles totales de CoQ₁₀ nos indicaban que *ADCK2* estaría implicado en la ruta de síntesis del CoQ₁₀, la mayor tasa de síntesis nos estaría indicando que *ADCK2*, aun estando relacionado con la síntesis de CoQ₁₀, podría no formar parte de la maquinaria catalítica de la ruta, pudiéndose reservar un papel más bien regulatorio.

1.3. Determinación de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria

La cadena respiratoria de transporte de electrones es un elemento que se ve afectado típicamente en pacientes con enfermedades mitocondriales, como es el caso de pacientes con mutaciones en los genes *COQ* de biosíntesis del coenzima Q. En fibroblastos de pacientes con mutaciones en *COQ2* se han visto afectadas las actividades de los complejos I+III y II+III (López-Martín et al., 2007), mientras que en fibroblastos de un paciente con mutaciones en *PDSS2* se han visto afectadas las actividades de los complejos I y II+III (López et al., 2006). Nosotros quisimos analizar el estado de la cadena respiratoria en los pacientes con mutaciones en *ADCK2*.

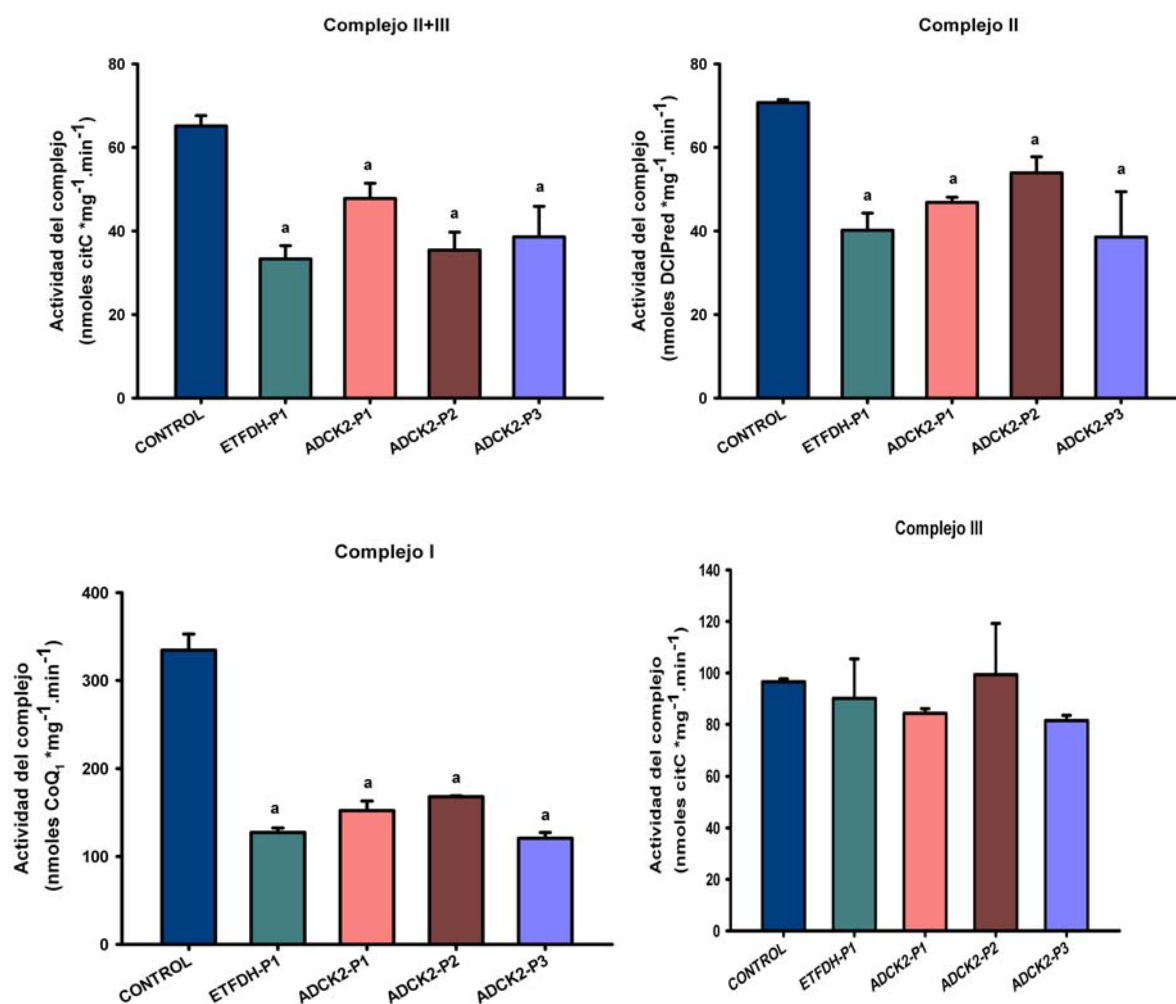


Figura 15. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. La actividad de cada complejo se cuantificó a partir de 25 µg de proteína de mitocondria cruda purificada a partir de cuatro frascos confluentes de células de 175 cm². El mismo día de la recogida de las células y la purificación de las mitocondrias se midieron las actividades de los complejos III y II+III. Las actividades de los complejos I y II se midieron el día posterior. a=P<0,05.

Hemos observado un comportamiento similar en los fibroblastos de todos los pacientes, tanto de *ADCK2* como de *ETFDH*, en cuanto a las actividades medidas. El dato de la actividad del complejo I+III no se muestra, ya que no fue repetitivo ni concluyente. De hecho existe controversia respecto a los métodos de medida, e incluso en la metodología utilizada (Frazier & Thorburn, 2012) la medida de la actividad del complejo I+III no aparece descrita. Recientemente se ha publicado un conjunto de métodos que eliminan los problemas derivados de la medida de la actividad de la cadena respiratoria, entre ellos los del I+III (Spinazzi, Casarin, Pertegato, Salviati, & Angelini, 2012), y con el que se realizará la medida en un futuro en estos fibroblastos. En cuanto al resto de las actividades, observamos un descenso en la actividad del

complejo II que varía desde un 24% en ADCK2-P2 a un 45% en ADCK2-P3. Este descenso también se observa al medir la actividad de los complejos II+III, variando de un 27% en ADCK2-P1 a un 46% en ADCK2-P2, sin embargo no encontramos diferencias significativas al medir la actividad del complejo III, por lo que podemos atribuir el descenso en el II+III a un defecto en el complejo II. El complejo II+III se utiliza como un sensor de coenzima Q, ya que el coenzima Q es vital para el paso de los electrones desde el complejo II al III y efectivamente observamos que esta actividad está afectada en todos estos pacientes, que además tienen déficit de CoQ₁₀. En cuanto al complejo I el descenso en la actividad respecto al control es incluso mayor, variando de un descenso del 50% en ADCK2-P2 a un 64% en ADCK2-P3, por lo que podemos determinar que el complejo I también se encuentra afectado en su funcionalidad en los fibroblastos de todos los pacientes.

Concluimos que los fibroblastos de los tres pacientes con mutaciones en *ADCK2* (y también en *ETFDH*) tienen defectos en los complejos I y II, precisamente los dos complejos de la cadena respiratoria a partir de los cuales se ceden electrones a la molécula de CoQ₁₀, no viéndose significativamente afectado el complejo III. El mayor defecto lo encontramos en el complejo I, un complejo que se relaciona con la β -oxidación de los ácidos grasos, ya que el complejo I recibe los electrones del NADH generados en esta ruta metabólica (Wang, Mohsen, Mihalik, Goetzman, & Vockley, 2010). La relación entre la cadena respiratoria y la β -oxidación es tan estrecha que incluso se ha observado que interaccionan físicamente (Wang et al., 2010). Esto unido al deficiente metabolismo de las grasas observado en el paciente ADCK2-P2, hacen necesario un estudio del estado de la β -oxidación en los fibroblastos de estos pacientes.

1.4. Determinación de la β -oxidación de los ácidos grasos

La β -oxidación de los ácidos grasos es un proceso que, en humanos, ocurre en la mitocondria y se encuentra íntimamente relacionado con la cadena mitocondrial de transporte de electrones a través del coenzima Q y el complejo I (Figura 16).

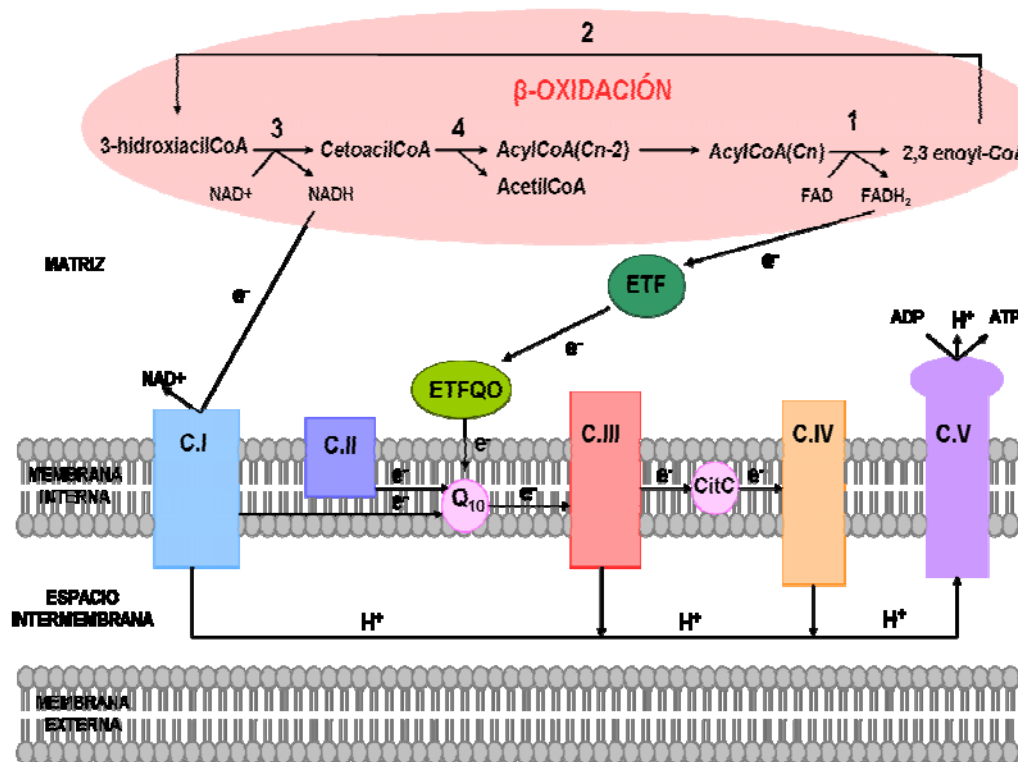


Figura 16. Relación entre la cadena de transporte de electrones y el ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria. La cadena de transporte de electrones mitocondrial se relaciona en dos puntos con la β -oxidación de los ácidos grasos, a través del NADH generado en el tercer paso de la β -oxidación que es utilizado por el complejo I y a través del FADH generado en el primer paso de la β -oxidación que es utilizado por el CoQ₁₀ a través del sistema ETF/ETFQO. Enzimas implicadas en la β -oxidación; 1 (Acil-CoA deshidrogenasa), 2 (EnoylCoA hidratasa), 3 (Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), 4 (Tiolasa).

En la primera reacción de la β -oxidación la enzima acil-CoA deshidrogenasa transforma el acil-CoA en trans- Δ^2 -enoyl-CoA generando poder reductor mediante la reducción de FAD a FADH₂. Esos electrones del FADH₂ son cedidos a la proteína ETF y posteriormente a la proteína ETFQO, que es el producto proteico del gen *ETFDH*, que finalmente los cede a la cadena de transporte de electrones a través del coenzima Q. Por tanto, la β -oxidación y el coenzima Q se encuentran relacionados a través de la proteína ETFQO.

Mutaciones en *ETFDH* afectan negativamente a la β -oxidación al no poderse dar salida al poder reductor generado en este proceso (Law et al., 2009; Olsen et al., 2007). El FADH generado se acumula y el FAD no puede ser regenerado por lo que la primera reacción de la β -oxidación se ve afectada ralentizando todo el ciclo. Los acil-CoAs se convierten en acil-carnitinas, se acumulan y finalmente pasan a la sangre. Además de

afectar a la β -oxidación, también se ha visto que mutaciones en *ETFDH* pueden provocar una deficiencia en la cantidad total de CoQ₁₀ en homogenado muscular (Gempel et al., 2007) aunque hay otros pacientes en los que no se ha detectado una deficiencia de CoQ₁₀ (Liang et al., 2009). Esto se corresponde con lo observado en el apartado 1.1. en ETFDH-P1, donde encontramos un déficit en los niveles totales de CoQ₁₀. Este descenso en los niveles de CoQ₁₀ probablemente es debido a que, por algún mecanismo de retroalimentación, se regula negativamente la síntesis de CoQ₁₀ (Gempel et al., 2007). También existe la opción de que la unión defectuosa de la enzima al CoQ₁₀ provoque la degradación de éste (Olsen et al., 2003). Por tanto, mutaciones en *ETFDH*, además de afectar negativamente a la β -oxidación puede provocar un déficit en la cantidad de CoQ₁₀, algo que quisimos ver si también ocurría en los fibroblastos de pacientes con mutaciones en *ADCK2*.

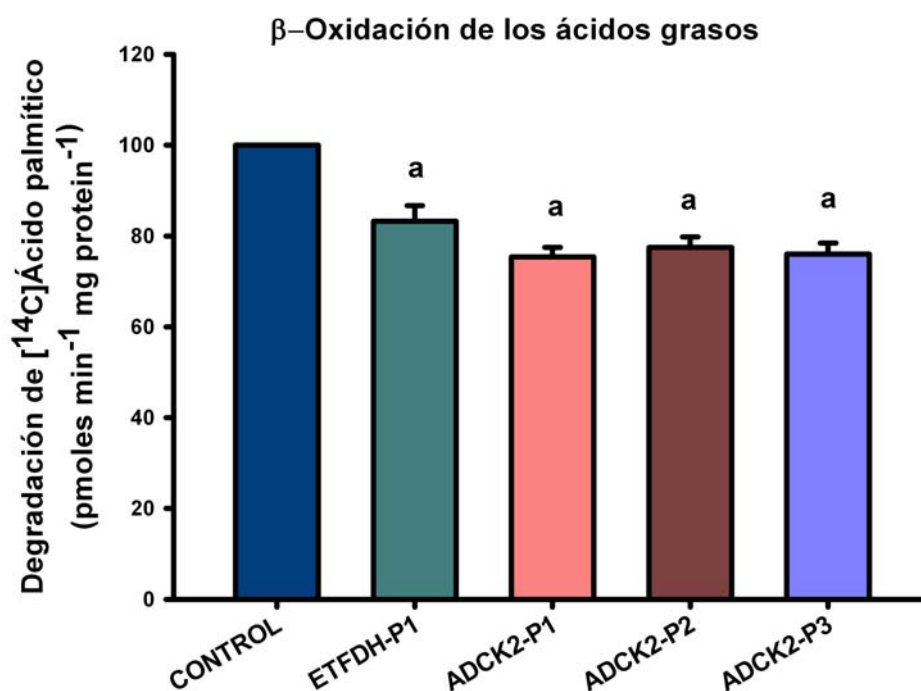


Figura 17. Medida del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos. Se utilizó un homogenado de células cultivadas previamente un mínimo de 72 horas. Para calcular la actividad del ciclo se añadió [¹⁴C]ácido palmítico y se determinó su nivel de degradación tras medir las fracciones soluble (con el ¹⁴C proveniente de su degradación) y no soluble (con el [¹⁴C]ácido palmítico no degradado) en el contador de centelleo. a=P<0.05

Como era de esperar encontramos en ETFDH-P1 un ralentizamiento en la degradación de los ácidos grasos, concretamente del 17%, pero en el resto de

pacientes del ADCK2 encontramos también un descenso similar, aunque algo más acentuado, en torno al 25%.

La disminución en la degradación de los ácidos grasos en los pacientes con mutaciones en *ADCK2* nos lleva a pensar que esta proteína podría encontrarse relacionada con este proceso. Al comportarse las células con mutaciones en *ADCK2* de forma similar a ETFDH-P1, en principio no podemos discernir si *ADCK2* está implicado directamente en la ruta de biosíntesis del CoQ₁₀, de una forma reguladora mejor que catalítica como se ha indicado anteriormente, o si está implicado directamente en la regulación del ciclo de la β -oxidación. Lo que parece claro es que mutaciones en *ADCK2* afectan directamente a ambos procesos, de igual forma que ocurre con ETFDH-P1.

Para comprobar si mutaciones en genes implicados directamente en el ciclo de la β -oxidación también provocaban una afección al nivel total de CoQ₁₀, se midió el CoQ₁₀ en fibroblastos de pacientes con mutaciones en la palmitoiltransferasa de carnitina tipo II (CPTII-P1) y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (VLCAD).

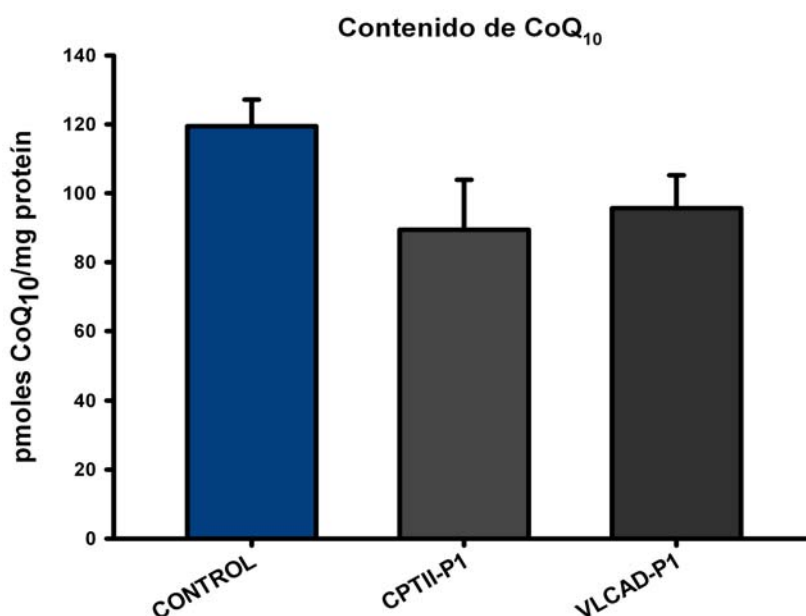


Figura 18. Contenido de CoQ₁₀ en fibroblastos de pacientes con mutaciones en enzimas de la β -oxidación. La cantidad de CoQ₁₀ se determinó a partir de un homogenado de células tras un mínimo de 72 horas de cultivo. Tras extraer los compuestos lipídicos, éstos se separaron mediante HPLC-ECD. Se usaron células HDF de adulto como control.

La CPTII es responsable, en la matriz mitocondrial, del paso de acil-carnitina a acil-CoA y carnitina, regenerándose la carnitina hacia el citosol para transportar más ácidos grasos y comenzando el acil-CoA su degradación en la β -oxidación. La acil-CoA deshidrogenasa es la responsable del primer paso de la β -oxidación al transformar el acil-CoA en trans- Δ^2 -enoil-CoA usando FAD como cofactor. Hay tres tipos de acil-CoA deshidrogenasa según la longitud del ácido graso a degradar, la de cadena corta, cadena media y cadena larga.

En la figura 18 se presenta el contenido de CoQ₁₀ de fibroblastos de pacientes con mutaciones en CPTII y VLCAD. El contenido de CoQ₁₀ muestra una ligera tendencia a disminuir, aunque no existen cambios significativos respecto al valor control. Por tanto, mutaciones en enzimas que actúan directamente en el ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos no parecen afectar a los niveles totales de CoQ₁₀, al contrario que en los casos de células de pacientes con mutaciones en *ETFDH* y *ADCK2*. Con este dato, descartaríamos una implicación directa de *ADCK2* en el ciclo de la β -oxidación para explicar la deficiencia de CoQ₁₀.

El déficit de CoQ₁₀ en el caso de *ETFDH*-P1 se puede explicar ya que, al contrario de los casos de CPTII-P1 y VLCAD-P1, no se debe olvidar que *ETFDH*, aun no estando implicada en la ruta de síntesis del CoQ₁₀ ni en su regulación, tampoco lo está directamente en la β -oxidación, es un nexo de unión entre los dos procesos. Sin embargo, ETFQO está íntimamente relacionado con el CoQ₁₀ e interactúa directamente con él, por lo que mutaciones en *ETFDH* pueden acarrear un déficit de CoQ₁₀ como se ha explicado anteriormente en este mismo apartado.

Si *ADCK2* fuera un elemento puramente regulador de la β -oxidación, mutaciones en él no conllevarían un déficit en la cantidad de CoQ₁₀, de la misma forma que mutaciones en las enzimas CPTII y VLCAD no acarrearán un déficit de CoQ₁₀. Si partimos de la hipótesis de que *ADCK2* es un elemento de la ruta de síntesis del CoQ₁₀, mutaciones en *ADCK2*, al igual que en *ETFDH*, afectarían negativamente, como hemos visto ya en el punto 1.1, a la ruta de síntesis de CoQ₁₀. Sin embargo, ¿cómo podríamos explicar la afectación negativa de mutaciones en *ADCK2* sobre la β -oxidación?

La β -oxidación de los ácidos grasos y la cadena transportadora de electrones se encuentran estrechamente relacionados; de hecho estudios en hígado y músculo

esquelético de rata han mostrado que existe una interacción física entre ambos (Vockley, 2008). Se ha observado que defectos en la cadena respiratoria pueden provocar una inhibición de la β -oxidación. De hecho en células Rho⁰ que carecen de ADNmt, y por tanto de actividad en la cadena respiratoria, la β -oxidación se encuentra completamente inhibida a pesar de tener niveles normales de las enzimas implicadas en dicho ciclo (Jackson, 2013). Existe también el caso de una paciente, de la que se desconoce si presenta mutaciones en genes, con un cuadro clínico extremadamente parecido al de ADCK2-P2, con fragilidad muscular, acidosis láctica y acumulación intramuscular de lípidos. Dicha paciente tenía una deficiencia casi total en la actividad del complejo I medido en músculo esquelético y algo más ligera en los complejos III y IV. En esta paciente la β -oxidación de los ácidos grasos se encontraba disminuida en un 34% respecto al control (Watmough et al., 1990), valor parecido al que encontramos en los fibroblastos de pacientes del ADCK2. Llama la atención que con un descenso solo moderado de la β -oxidación, se observe una acumulación significativa de intermediarios de acil-CoAs y un llamativo fenotipo de acumulación de lípidos en el músculo. Hay que tener en cuenta que la medida del proceso “*in vitro*” es en condiciones óptimas, por lo que es de esperar que el proceso β -oxidativo se encuentre más afectado “*in vivo*”, donde observamos el fenotipo de acumulación de lípidos. Llama la atención también que el patrón de los intermediarios encontrados en esta paciente es similar al que se encuentra al medir la β -oxidación en muestra de hígado de rata tras inhibir el complejo I con rotenona. Con el uso de la rotenona, que es un inhibidor del complejo I, se inhibe la actividad del complejo I en un 95% y esto acarrea una disminución en el flujo de la β -oxidación del 75% (Clark, Hayes, Morgan-Hughes, & Byrne, 1984).

De la misma forma que ETFQO se relaciona con la β -oxidación debido a que cede los electrones provenientes del primer paso de la β -oxidación al coenzima Q, el complejo I se relaciona con la β -oxidación, ya que recibe los electrones del NADH generado en la tercera reacción de la β -oxidación, que la lleva a cabo la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Parece claro, por tanto, que defectos en la cadena respiratoria y concretamente en el complejo I, que es el complejo más afectado en los fibroblastos de los tres pacientes con mutaciones en ADCK2, acarrearán una disminución en el flujo

de la β -oxidación y, por tanto, esto podría explicar la deficiente β -oxidación encontrada en estos pacientes. Al no poder dar salida la β -oxidación al NADH generado, debido a la baja actividad del complejo I, éste se acumularía, no pudiéndose regenerar el NAD^+ , afectando a la reacción catalizada por la acil-CoA deshidrogenasa, provocando la ralentización del ciclo de degradación de los ácidos grasos.

Por todo esto, nos inclinamos a pensar que *ADCK2* no está implicado directamente en la regulación de la β -oxidación de los ácidos grasos y sí en la ruta de síntesis del CoQ_{10} , probablemente de una forma más reguladora que catalítica, ya que mutaciones en él no hacen disminuir la tasa de síntesis, como se vio en el punto 1.2. *ADCK2*, por tanto, regularía de alguna forma, directa o indirectamente, la ruta de síntesis del coenzima Q, afectando, indirectamente a la ruta de degradación de los ácidos grasos, debido a un defecto en el complejo I de la cadena respiratoria.

1.5. Determinación de los niveles de L-Lactato en el medio de cultivo celular

Un nivel alto de lactato en sangre es indicativo de una alteración en el normal funcionamiento de la respiración celular. Además de ocurrir en deportistas tras un gran esfuerzo, unos niveles altos de lactato en sangre se pueden observar en un amplio rango de enfermedades incluidas infecciones y desórdenes metabólicos, como por ejemplo en algunos pacientes con diabetes (Krzymień & Karnafel, 2013). También es habitual encontrar este signo clínico en las enfermedades mitocondriales.

Cuando la oxidación aeróbica en la célula no es posible, el piruvato y NADH generados en la glucólisis no siguen su camino hacia el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, si no que se reconduce hacia un proceso de fermentación en el que el NADH reduce el piruvato hacia lactato. Cuando el nivel de lactato en sangre es demasiado alto y alcanza niveles superiores a 5 mmol/L se produce la denominada “acidosis láctica” (Krzymień & Karnafel, 2013) provocando una disminución del pH sanguíneo que si no es controlada puede acarrear la muerte del individuo.

Como hemos comentado, la acidosis láctica es signo clínico habitual en las enfermedades mitocondriales, de hecho el nivel de lactato en plasma del paciente

ADCK2-P2 es de 6.6 mmol/L por lo que sufre acidosis láctica. Por tanto, es de interés observar el nivel de lactato en el medio de cultivo de los fibroblastos de los pacientes.

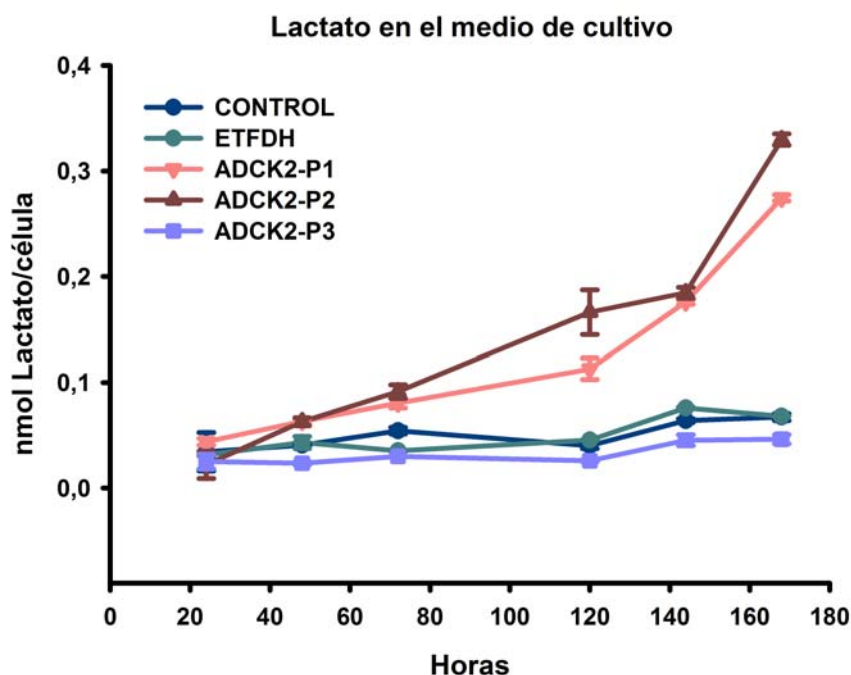


Figura 19. Concentración de lactato en el medio de cultivo estandarizado por célula. Se sembraron 25000 células por cada pocillo y se usó un pocillo distinto por cada medida de tiempo. En cada muestra se midió el L-lactato total y se dividió por el número de células. Como control, se midió el L-lactato paralelamente en los mismos tiempos, en medio de cultivo sin células y se restó al L-lactato total medido en las células.

Se pudo observar como en el caso de los fibroblastos de los hermanos ADCK2-P1 y ADCK2-P2 se produjo una acumulación de lactato en el medio de cultivo muy superior al control de células HDF y al resto de células de pacientes (Figura 19). Este aumento llegó a más de los 0.33 nanomoles lactato/célula en el caso de ADCK2-P2 frente a los poco más de 0.07 nanomoles lactato/célula en el caso del control.

Estos datos encajan con el hecho de que el paciente ADCK2-P2 padezca acidosis láctica, situación que se reproduce en sus fibroblastos en cultivo. El paciente ADCK2-P1, con la misma mutación que ADCK-P2, está aparentemente sano y, por tanto, no se le ha medido nunca los niveles de lactato en sangre. Es posible que el nivel de lactato en sangre se encuentre aumentado, o que si es normal, no podemos descartar que bajo ciertas condiciones y en determinados momentos, la mutación presente en *ADCK2* le haga aparecer el fenotipo de acidosis láctica, de igual forma que se reproduce en sus fibroblastos.

Los fibroblastos de ETFDH.P1 y ADCK2-P3 no presentan una acumulación de lactato en el medio superior a las células control. Estos dos pacientes tampoco presentan niveles alterados de lactato en sangre. El hecho de que ADCK2-P3 muestre resultados diferentes a ADCK2-P1 y P2 constituye la primera diferencia fenotípica significativa entre pacientes que poseen mutaciones diferentes localizadas en el gen ADCK2.

La acumulación de lactato en el medio de cultivo de los fibroblastos ADCK2-P1 y P2 nos indica un mal funcionamiento de la respiración aeróbica, y por tanto de la cadena de transporte de electrones, como hemos podido constatar en el punto 1.3. Esto, unido al mal funcionamiento del ciclo de la β -oxidación, nos lleva a la conclusión de que mutaciones en el gen *ADCK2* estarían provocando un mal funcionamiento de los procesos más importantes del metabolismo mitocondrial. Para intentar observar un indicio más de este mal funcionamiento general de la mitocondria quisimos evaluar el grado de reciclaje mitocondrial mediante la determinación de la mitofagia, así como también del grado de autofagia en los fibroblastos de los pacientes.

1.6. Determinación de la autofagia y mitofagia

La macroautofagia (denominada autofagia para simplificar) es un proceso de degradación mayormente involucrado en el reciclaje y renovación de los componentes citoplasmáticos, incluidos organelas enteras (Mariño & López-Otín, 2004). Se trata de un proceso catabólico, altamente regulado, conservado a lo largo de la evolución en células eucariotas, desde levaduras a mamíferos, y que es vital en el mantenimiento de la homeostasis celular. Fue acuñado por De Duve, el descubridor de los lisosomas, en la década de los 60, al describir la presencia de vesículas de membrana simple o doble que contenían porciones de citoplasma u orgánulos para su degradación (De Duve & Wattiaux, 1966).

Se habla de mitofagia cuando la degradación selectiva por autofagia se realiza mayormente sobre las mitocondrias. Se trata de una especie de mecanismo de control de calidad del orgánulo, donde la célula degrada las mitocondrias que presenten una acumulación de daño tal que no puedan ser subsanadas por los sistemas de reparación, como, por ejemplo ocurre con mitocondrias afectadas por la acumulación

de daño causado por ROS. Una disfunción mitocondrial como la que hemos observado en los fibroblastos provenientes de los pacientes puede acarrear una mayor tasa de degradación de las mitocondrias y por tanto un mayor grado de mitofagia, por lo que decidimos evaluar dicho parámetro.

A

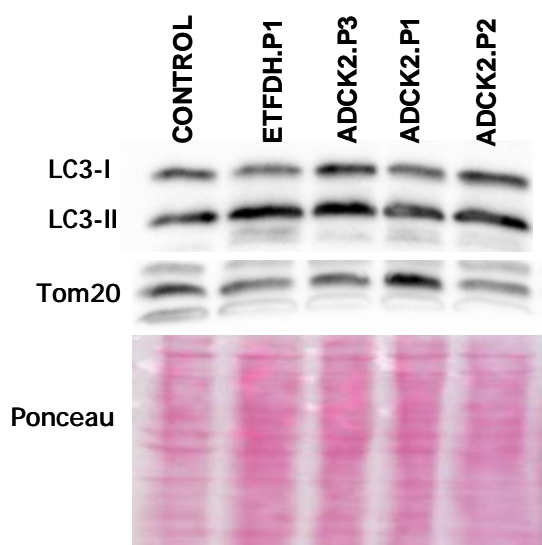
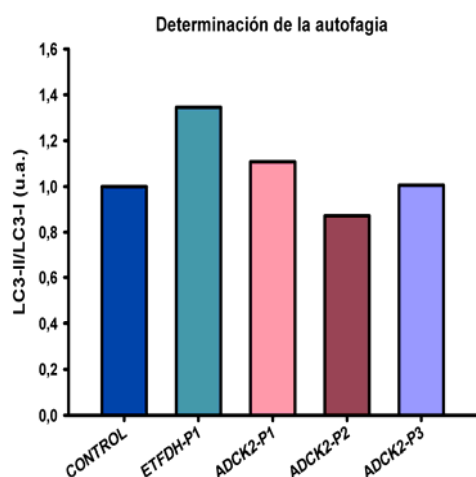
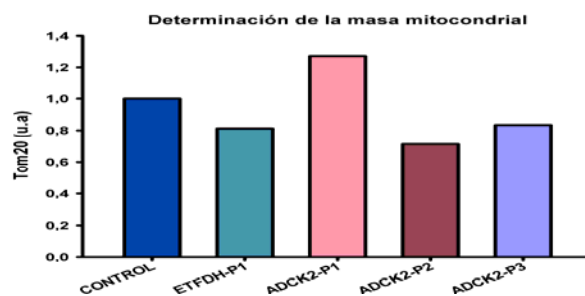


Figura 20. Determinación de la autofagia y la mitofagia. A) Inmunotinción a partir de una extracción de 50 µg de proteínas totales de un homogenado de fibroblastos donde se usa LC3 como marcador de autofagia y TOM20 como marcador de masa mitocondrial. Como control de carga se usó la tinción con Ponceau-S. Experimento representativo de una serie de ellos. **B)** Representación de la cantidad de proteína LC3 cuantificada en A) con el programa ImageJ y normalizarlas con la tinción con Ponceau-S. **C)** Representación de la cantidad de proteína TOM20 cuantificada en A) de la misma forma que en B).

B



C



Como se puede observar en la figura 20, para la determinación de la autofagia se cuantificó la cantidad de proteína LC3 presente en las células. LC3 es una proteína implicada en la formación del fagóforo durante el proceso de autofagia que en su forma soluble es inactiva tiene 16 kDa y se denomina LC3-I. Cuando se desencadena el

proceso de autofagia, LC3-I es modificada por las proteínas Atg3 y Atg7 dando lugar a LC3-II, la forma activa y que permanece unida a membrana, con un tamaño de 14 kDa (Mizushima, Ohsumi, & Yoshimori, 2002). Por tanto, cuanto mayor sea el cociente LC3-II/LC3-I mayor será la abundancia de autofagosomas y de la autofagia (Kabeya et al., 2004). En los fibroblastos de los pacientes con mutaciones en *ADCK2* no hemos podido detectar un aumento apreciable del proceso de autofagia, tan solo en el caso de ETFDH-P1 un aumento del 34%.

Para intentar detectar si la tasa de mitofagia en los fibroblastos de los pacientes estaba aumentada, se determinó la cantidad de masa mitocondrial mediante el marcador TOM20, una proteína que se encuentra localizada en la membrana externa mitocondrial (Bowers & Ardehali, 2006). Se detectó un descenso en la cantidad de masa mitocondrial respecto del control en *ADCK2*-P2 Y P3 del 29 y 17 % respectivamente, además de un descenso del 19 % en ETFDH-P1, sin embargo *ADCK2*-P1 no solo no muestra una menor cantidad de masa mitocondrial, sino que presenta un valor mayor que el control, de un 27 %.

En principio, la menor presencia de masa mitocondrial en *ADCK2*-P2 y P3 no la podemos atribuir específicamente a una mayor mitofagia, ya que de ser así la autofagia debería estar claramente aumentada también (en ETFDH-P1 si podríamos hablar de mitofagia, al detectarse un aumento de la autofagia). Este resultado lo debemos considerar como preliminar, ya que el estudio de la autofagia/mitofagia requiere de un análisis más profundo, con la evaluación de otros parámetros, como por ejemplo mediante el uso de un marcador adicional de RE o realizar la medida en condiciones de inducción de la autofagia con el cultivo de las células en ausencia de suero fetal bovino, ya que se ha observado que la autofagia se estimula ante la escasez de nutrientes (Mizushima, 2007). La disminución de la masa mitocondrial observada en los fibroblastos de los pacientes que presentan un fenotipo patológico, *ADCK2*-P2 y P3, podría deberse a la presencia de un menor número de mitocondrias, sin embargo este resultado preliminar encaja con el hecho de que se ha observado que las células con deficiencia de coenzima Q tienen un mayor grado de mitofagia (Rodríguez-hernández et al., 2009).

1.7. Niveles de ARNm de *ADCK2* y genes de la ruta de síntesis del CoQ₁₀

Detectar los niveles de ARNm de *ADCK2* en las células de los pacientes es de especial interés, al así poder relacionar como la mutación concreta de cada paciente afecta a la expresión del gen. Además es interesante observar como la variación en la expresión de *ADCK2* puede afectar a otros genes como los genes de la ruta de síntesis del CoQ₁₀.

En la figura 21 podemos observar una expresión diferencial del gen en los tres pacientes del *ADCK2*. *ADCK2*-P1 tiene una expresión un 40% menor que el control y *ADCK2*-P2 un 60% menor, mientras que *ADCK2*-P3 tiene un ligero aumento de la expresión del gen en torno a un 25% respecto al control aunque no es significativo. *ETFDH*-P1 podemos considerar que prácticamente no tiene afectada la expresión de *ADCK2* respecto al control, al mostrar solo un ligero aumento del 13%.

Para corroborar que la cantidad de ARNm de *ADCK2* se correspondía con el nivel de expresión de la proteína *ADCK2*, realizamos una inmunotinción a partir de una extracción total de proteínas de un homogenado celular, como se observa en la figura 22. Observamos un descenso en la cantidad de proteína en los fibroblastos *ADCK2*-P1 y P2 de un 50% y 26% respectivamente, mientras que *ETFDH*.P1 y *ADCK2*-P3 muestran un ligero aumento del 17% y 18%.

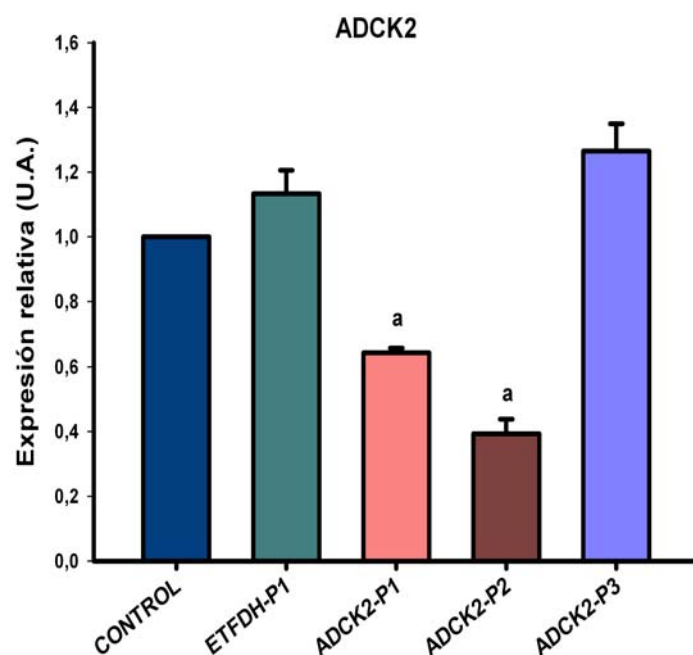


Figura 21. Expresión relativa del gen *ADCK2*. Niveles de ARNm de *ADCK2* en las células de pacientes detectados por PCR a tiempo real. Como control se usaron células HDF. $a=P<0.05$ solo se señala cuando la diferencia es mayor a un 50% o menor de un 20% respecto al control.

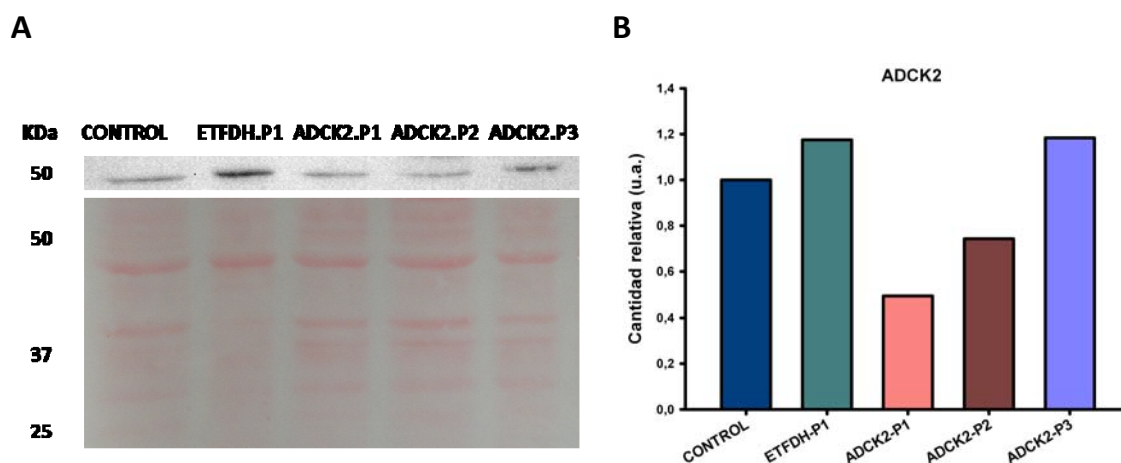


Figura 22. Cantidad de la proteína *ADCK2*. **A)** En la parte superior inmunotinción con el anticuerpo anti-*ADCK2*, en la parte inferior tinción con Ponceau-S de la misma membrana de nitrocelulosa utilizada en la inmunotinción, utilizada como control de carga. Se cargaron 15 μ g de una extracción de proteínas a partir de un extracto total de células. Experimento representativo de una serie de ellos. **B)** Representación de la cantidad de proteína *ADCK2* cuantificada en A) con el programa ImageJ y normalizarlas con la tinción con Ponceau-S.

Los datos de expresión de proteína fundamentalmente concuerdan, por tanto, con los de cantidad de ARNm. Solo deberíamos destacar que la disminución en el nivel de ARNm en *ADCK2*-P1 y P2 no se corresponde con un descenso tan acusado en el nivel de proteína posterior.

ADCK2-P1 y ADCK2-P2 son hermanos y tienen la misma mutación en *ADCK2*, por lo que es lógico que el nivel de expresión del gen sea similar en ambos. El tipo de mutación que encontramos en ambos individuos, la generación de un codón de stop prematuro, hace que el ARNm previsiblemente de lugar a una proteína estructuralmente no viable, por lo que ese ARNm estará menos tiempo traduciéndose y es posible que sea degradado antes, explicando así la baja cantidad detectada. Sin embargo, en el caso de ADCK2-P3 la mutación es puntual, de cambio de una sola base, por lo que el ARNm, en principio, debería dar lugar a una proteína estructuralmente viable, esperándose unos niveles de ARNm normales. Sin embargo, en ADCK2-P3 se observa una ligera sobreexpresión que puede ser explicada por la falta de funcionalidad de la proteína. La célula, por tanto, mediante un proceso de retroalimentación podría estar regulando la expresión de *ADCK2*, aumentándola ligeramente, para suplir la carencia de actividad de la proteína. La explicación a una mayor o menor cantidad relativa de ARNm de *ADCK2* en los fibroblastos de pacientes es especulativa, pero, por ejemplo, se ha observado que en fibroblastos de pacientes con una mutación puntual en homocigosis en el gen *COQ2*, la cantidad de ARNm de *COQ2* aumenta respecto al control (López-Martín et al., 2007), de forma análoga a como sucede en el caso de ADCK2-P3.

También medimos la cantidad de ARNm de los genes *COQ* de la ruta de biosíntesis del coenzima Q en los fibroblastos de pacientes con mutaciones en el *ADCK2*. En general, la mayoría de los genes de la ruta de biosíntesis se comportaban de forma parecida, ya que la expresión la encontramos aumentada respecto al control, especialmente en los dos pacientes que presentan signos patológicos ADCK2-P2 y ADCK2-P3, como se observa en la figura 23. En ADCK2-P2 y P3 solamente no encontramos una expresión aumentada en *COQ6* y *COQ4*, mientras que en ADCK2-P1 no la encontramos en *COQ5*, *COQ6* y *COQ8*. Este aumento de la expresión general de los genes *COQ* puede responder a un efecto compensatorio en un intento de suplir el déficit de CoQ₁₀ en estas células intentando aumentar la expresión de las proteínas responsables de la síntesis de éste.

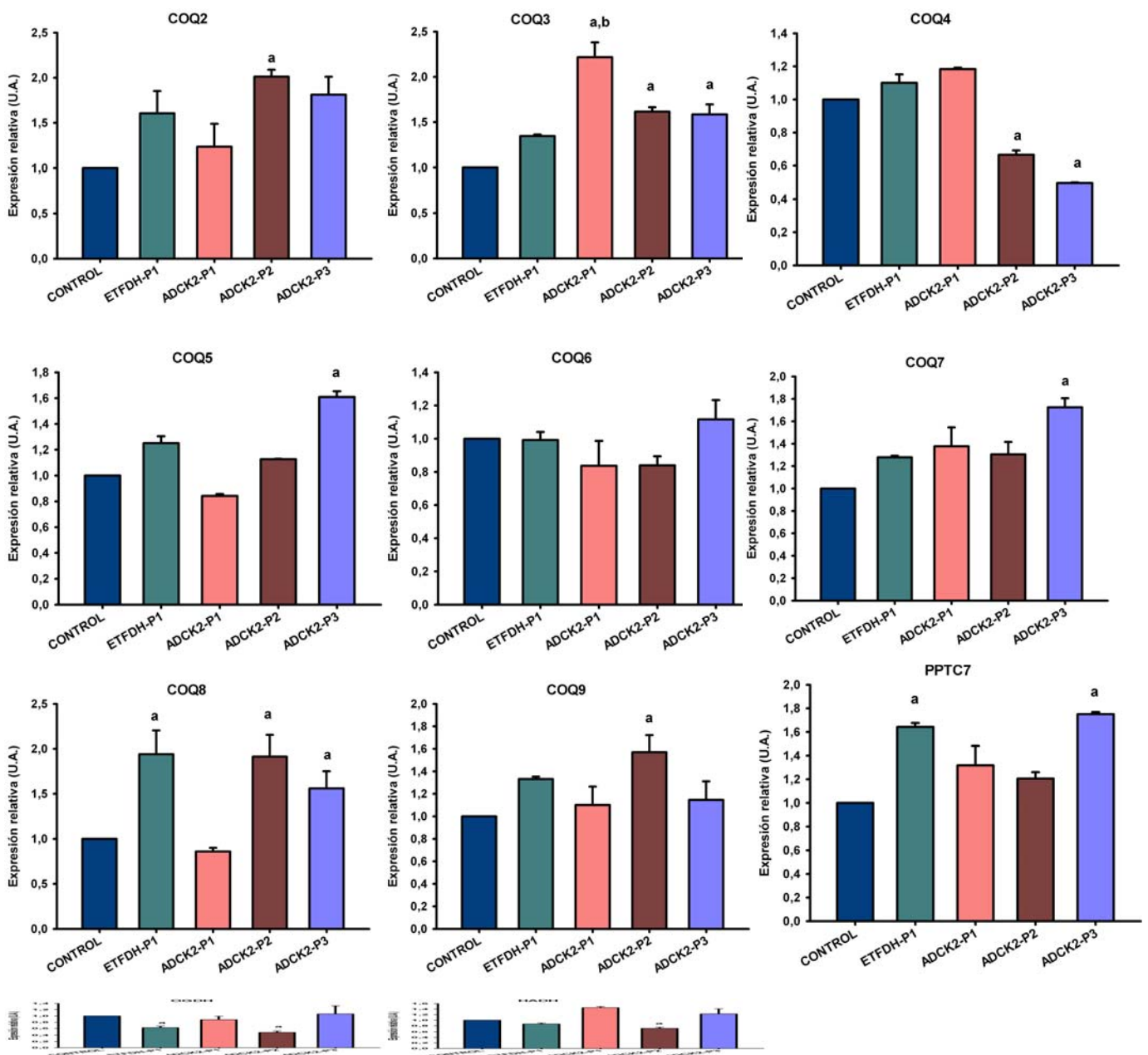


Figura 23. Expresión de los genes COQ. Niveles de ARNm medidos por PCR a tiempo real de todos los pacientes respecto al control de células HDF. a,b=P<0.05 solo se señala cuando la diferencia es mayor a un 50% o menor de un 20% respecto al control.

Este hecho del aumento generalizado de los genes *COQ* se relaciona directamente con los datos de tasa de síntesis de CoQ₁₀ del punto 1.2. Las células de estos pacientes tienen un déficit de CoQ₁₀ debido a mutaciones en *ADCK2* y para suplir esta carencia incrementarían la expresión general de los genes *COQ* en un intento de aumentar los niveles de CoQ₁₀, consiguiendo aumentar la tasa de síntesis al encontrarse en condiciones saturantes de precursor pHB.

En *ADCK2*-P2 y P3 encontramos la expresión especialmente aumentada en *COQ2*, *COQ3* o *COQ8*. También *PPTC7*, que codifica para una fosfatasa que defosforila y activa la proteína Coq7 activando por tanto la síntesis del coenzima Q (González-Mariscal, 2011), muestra una expresión aumentada en las células de todos los pacientes, apoyando la idea de que mutaciones en *ADCK2* provocan un aumento general de la expresión de los genes implicados en la ruta de síntesis del coenzima Q.

En el caso de *ETFDH*-P1 ocurre lo mismo que en los pacientes del *ADCK2*, todos los genes *COQ*, excepto *COQ6*, se encuentran aumentados, aunque, en general, de forma solamente ligera; probablemente por la misma causa que en el caso de los pacientes del *ADCK2*, el déficit de CoQ₁₀. Todo lo explicado para las células con mutaciones en *ADCK2* se puede aplicar a los fibroblastos *ETFDH*-P1.

Cabe destacar el caso de la expresión de *COQ4*, que es el único gen en el que encontramos una disminución de la expresión clara en los fibroblastos de los pacientes del *ADCK2*. Hasta la fecha se dispone de poca información sobre *COQ4*, pero se sabe que, al contrario del resto de genes *COQ*, no parece ser un elemento catalítico en la ruta de síntesis del coenzima Q, sino regulador implicado en el ensamblaje del complejo de síntesis (B. Marbois, Gin, Gulmezian, & Clarke, 2009).

Para testar otras rutas metabólicas de la mitocondria se midió la expresión de dos genes, la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*HADH*) enzima responsable del tercer paso de la β -oxidación de los ácidos grasos, y la oxoglutarato deshidrogenasa, responsable del paso de α -cetoglutarato a succinil-CoA en el ciclo de Krebs. En estos dos casos los resultados fueron variables y no se pudo obtener una conclusión clara.

2. Implicación del gen *ADCK2* en la síntesis de coenzima Q

En el capítulo anterior se ha realizado un estudio del *ADCK2* a partir de células de pacientes con mutaciones en este gen. Se ha podido observar que estas células tienen deficiencia de CoQ₁₀, pero una tasa de síntesis, en condiciones saturantes, incrementada, hecho que está apoyado también por el hallazgo de que la mayoría de los genes *COQ* tienen una expresión aumentada en estos pacientes, como un mecanismo para compensar el déficit de CoQ₁₀ aumentando la tasa de síntesis. Estas mutaciones afectarían también a la cadena respiratoria, sobre todo a la actividad del complejo I, afectando indirectamente al ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos. Este mal funcionamiento general del metabolismo mitocondrial llevaría a la célula, en algunos casos, a una acumulación de lactato en el medio de cultivo y a una menor cantidad de masa mitocondrial, quizás por un aumento de la mitofagia.

Probablemente, por tanto, *ADCK2* estaría implicado en la ruta de síntesis del CoQ₁₀. Mutaciones en el gen provocarían una deficiencia de CoQ₁₀ afectando la actividad de la cadena respiratoria y la β -oxidación, pero no participando de forma catalítica, ya que la tasa de síntesis estaría disminuida, sino quizás de una forma probablemente reguladora, modulando la actividad de algún elemento de la ruta de síntesis del CoQ₁₀. También es posible que *ADCK2* no esté implicado en la ruta de síntesis del CoQ₁₀ y lo esté, por ejemplo, como un elemento asociado a los complejos respiratorios, y que mutaciones en el gen afecten a esta ruta de forma indirecta, como ocurre en el caso de *ETFDH*.

En este capítulo nos proponemos demostrar fehacientemente el papel de *ADCK2* en la ruta de síntesis de la coenzima Q mediante la complementación funcional en levaduras de las mutaciones encontradas en los pacientes y con estudios de sobreexpresión y silenciamiento transitorio de *ADCK2* en la línea celular MRC5.

2.1. Complementación de *ADCK2* en levaduras mutantes nulas en el gen ortólogo *YPL109c*

Para demostrar la implicación de *ADCK2* en la ruta de síntesis del coenzima Q nos propusimos analizar la estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* nula para el gen *YPL109c*, que, *a priori*, es el gen ortólogo a *ADCK2* en levadura, y comprobar si tenía afectado el nivel de coenzima Q. Si esto era así, rescataríamos los niveles normales de coenzima Q complementando esa estirpe de levadura con el gen humano *ADCK2*.

2.1.1. Relación del gen *ADCK2* humano con el gen *YPL109c*

Para empezar se realizó una búsqueda del gen ortólogo a *ADCK2* en *Saccharomyces cerevisiae*. Usando el sitio web <http://www.yeastgenome.org> se comparó la secuencia proteica de *ADCK2* con la base de datos de levadura arrojando como proteína con mayor similitud *YPL109c*, con un valor de $E=1.4e^{-59}$, quedando en segundo lugar *YLR253w* con un valor E mucho menor $E=1.3e^{-5}$. Por tanto, *YPL109c* es la clara candidata a ser la proteína ortóloga de *ADCK2* en levaduras. Cabe destacar que *YLR253w* tiene la mayor similitud con otro miembro de la familia ABC1, el *ADCK1*.

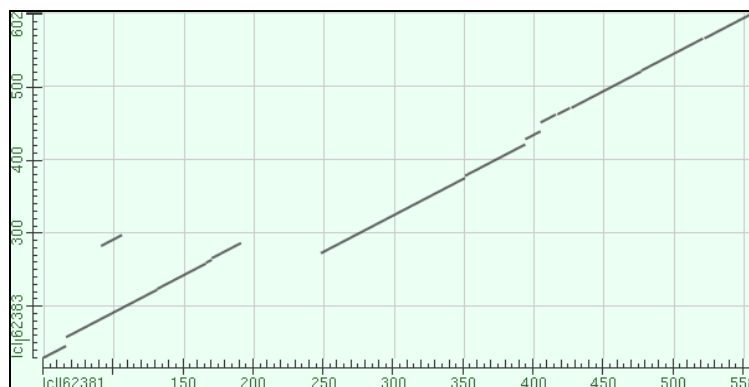


Figura 24. Matriz de puntos dotplot comparando las secuencias de las proteínas *ADCK2* e *YPL109c*. En el eje X se representa la secuencia proteica de *ADCK2*, mientras que en el eje Y se representa la de *YPL109c*. La línea diagonal representa el alineamiento de ambas secuencias por regiones de similitud. El alineamiento se realizó mediante la herramienta informática pBLAST del NCBI. Valor $E=5e^{-60}$

Adicionalmente se realizó un alineamiento de la secuencia proteica de ADCK2 e YPL109c en la herramienta bioinformática pBLAST del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> donde se observa una alta similitud entre ambas secuencias a través de la matriz de puntos dotplot (Figura 24) con un valor $E=5e^{-60}$. El porcentaje de identidad es del 35%, mientras que el porcentaje de positivos es del 54%. Podemos concluir, por tanto, que YPL109c es el gen ortólogo a ADCK2 en levadura.

2.1.2. Contenido de coenzima Q mitocondrial

Una vez identificado el gen YPL109c como el ortólogo de ADCK2 en levadura nos propusimos medir la cantidad de coenzima Q presente en la estirpe nula para YPL109c para observar si había un paralelismo con lo que ocurría en los fibroblastos de pacientes con mutaciones en ADCK2 respecto de la cantidad total de coenzima Q. En *Saccharomyces cerevisiae* el coenzima Q tiene una cola de seis isoprenos, por lo que se denomina CoQ₆ en contraste al CoQ₁₀ de humanos. Tras cultivar las estirpes y realizar una purificación de las mitocondrias (ver punto 5.7.1 de Materiales y Métodos) se extrajo y cuantificó el CoQ₆ a partir de 0.5 mg de proteína de estas mitocondrias.

Se puede observar en la figura 25 como la estirpe nula para YPL109c (D) tiene un 40% menos de CoQ₆ que la estirpe BY4741 (WT), por lo que la ausencia de YPL109c también acarrea una deficiencia de coenzima Q de forma y cantidad similar a lo que ocurre con los fibroblastos de pacientes con mutaciones en ADCK2.

Para estar seguros de que ese déficit de CoQ₆ se debía a la ausencia de YPL109c, intentamos recuperar los niveles de CoQ₆ de la estirpe BY4741 transformando la estirpe “D” con el gen YPL109c (D:YPL109c). Posteriormente hicimos lo mismo con ADCK2 (D:ADCK2), para ver si el gen humano podía suplir la función de YPL109c en levadura. Por último transformamos “D” con las versiones de ADCK2 con las mutaciones que portan los pacientes ADCK2-P1 y P2 (D:ADCK2Stop) y el paciente ADCK2-P3 (D:ADCK2Pun). También se generaron las estirpes con las mutaciones de los pacientes en YPL109c (D:YPL109cStop y D:YPL109cPun), para lo que se transformó con una versión de YPL109c con las mismas mutaciones que los pacientes en los

aminoácidos en la posición más parecida posible a donde se produce en el gen humano.

Todas las estirpes fueron transformadas con el plásmido multicopia y de carácter centromérico pRS426, incluyendo las estirpes WT y D que fueron transformadas con el plásmido vacío. La construcción de los vectores, así como la generación de las estirpes mutadas están detallados en el punto 4 de Materiales y Métodos así como en la tabla 2 de Materiales y Métodos.

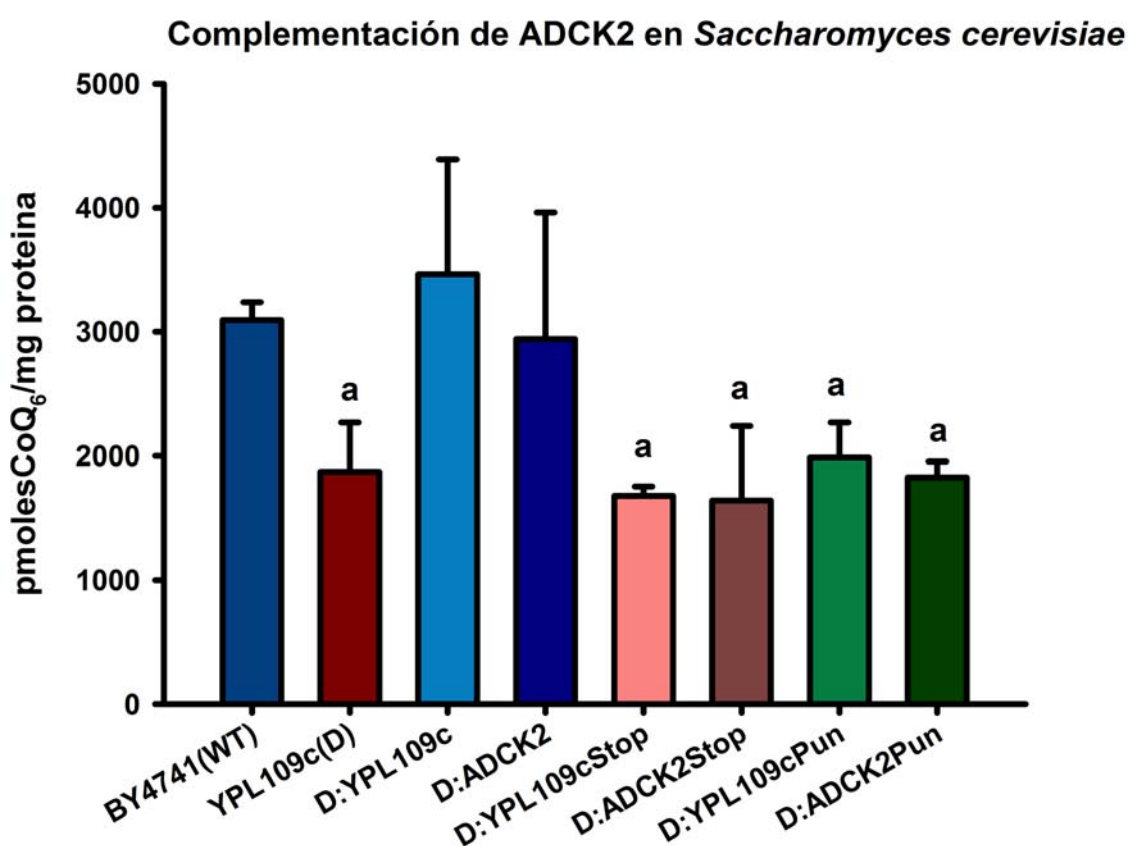


Figura 25. Determinación de la cantidad de CoQ₆ en las estirpes generadas en la complementación de ADCK2 en levadura. A partir de cultivos de 2 días en medio SD-Ura, se purificaron mitocondrias de todas las estirpes de levadura. A partir de 0.5mg de proteína de esas mitocondrias se extrajeron los componentes lipídicos y se cuantificó el CoQ₆ mediante HPLC-ECD. a=P<0.05

Como control de que las estirpes generadas estaban expresando el gen correspondiente se midió mediante PCR a tiempo real la expresión de los genes YPL109c y ADCK2. Se detectó expresión del gen *YPL109c* (tomando la estirpe WT como valor de referencia 1 u.a.) en D:YPL109c (22.57 ± 0.54 u.a.), D:YPL109cStop (36.31 ± 0.24

u.a) y D:YPL109cPun (52.16 ± 1.04 u.a.), no detectándose expresión en el resto de estirpes. Respecto a ADCK2, su expresión solo fue detectada en las estirpes que sobreexpresaban versiones de ADCK2 y en un nivel de expresión parecido a las estirpes que sobreexpresaban versiones de YPL109c, ya que el valor medio en el ciclo de amplificación en la PCR a tiempo real de las tres estirpes que sobreexpresaban *YPL109c* fue de 26.46, mientras que el valor medio en el ciclo de amplificación de las tres estirpes que sobreexpresaban ADCK2 fue de 25.23. Tomando como referencia la estirpe D:ADCK2Pun como 1u.a., D:ADCK2 tuvo una expresión de ADCK2 de 4.62 ± 0.12 u.a. y D:ADCK2Stop de 1.98 ± 0.15 u.a.

Tras cuantificar el descenso de CoQ₆ en la estirpe nula para *YPL109c*, se observó que al complementar con el propio gen de levadura *YPL109c*, la estirpe D:YPL109c recuperaba el nivel de CoQ₆ del WT e incluso lo superaba levemente con 3464 pmolesQ₆/mg proteína. Esto también ocurría en parte cuando la complementación ocurría con el gen humano *ADCK2* en la estirpe D:ADCK2 al alcanzar una cantidad de CoQ₆ ligeramente menor al WT, de 2941 pmolesQ₆/mg proteína. Cuando la complementación se realizó con las versiones de *YPL109c* y *ADCK2* incluyendo el mismo codón de stop prematuro que tiene *ADCK2* en ADCK2-P1 y P2 (D:YPL109cStop y D:ADCK2Stop), el nivel de CoQ₆ fue similar al que tiene la estirpe nula e incluso ligeramente menor, 1679 y 1642 pmolesQ₆/mg proteína respectivamente. En un grado similar observamos esto también, cuando D fue transformada con la mutación de ADCK2-P3, una mutación puntual de cambio de una prolina por una leucina en el aminoácido 606, generando las estirpes D:YPL109cPun y D:ADCK2Pun.

Hemos podido recuperar, al menos parcialmente, el nivel de CoQ₆ en la estirpe nula al expresar en multicopia el gen *ADCK2*. Esto demuestra que *ADCK2* puede suplir la función de *YPL109c* en levadura y que *ADCK2*, al igual que *YPL109c*, es un gen implicado en la ruta de síntesis de coenzima Q. Asimismo, hemos podido demostrar las consecuencias negativas que sobre la cantidad de coenzima Q tienen las mutaciones presentes en ADCK2-P1, P2 y P3, indicando que son las mutaciones en *ADCK2* las causantes del déficit de CoQ₁₀ de los pacientes y muy probablemente el origen del resto de sus signos patológicos.

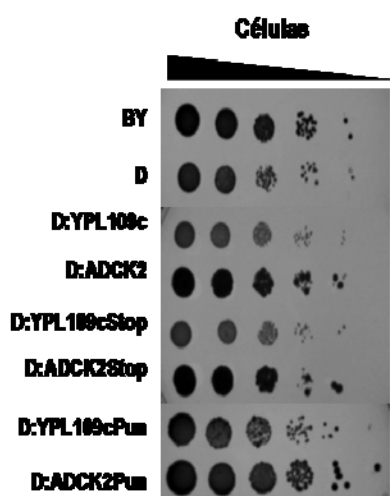
2.1.3. Crecimiento en medios con fuentes de carbono fermentables y no fermentables

Tras observar que en los fibroblastos de los pacientes, además de los niveles de CoQ₁₀, también se encuentran afectados la cadena transportadora de electrones, la β -oxidación, y en ADCK2-P1 y P2 los niveles de lactato en el medio de cultivo, nos propusimos evaluar la respiración celular de las estirpes generadas en la complementación en levaduras, dado que dichos datos en su conjunto indican un mal funcionamiento mitocondrial.

La levadura, en presencia de glucosa u otras fuentes de carbono fermentables, lleva a cabo de forma mayoritaria un metabolismo fermentativo, asimilándolas y generando como subproductos glicerol o etanol. Cuando la levadura se encuentra en un medio con una fuente de carbono no fermentable como el glicerol o etanol, su metabolismo se vuelve respiratorio y tiene que oxidar el glicerol mediante el ciclo de Krebs hasta CO₂ y H₂O, generando ATP mediante fosforilación oxidativa a través de la cadena de transporte de electrones.

Se ha observado que estirpes de levadura nulas para genes implicados directamente en pasos catalíticos de la ruta de biosíntesis del coenzima Q muestran una imposibilidad de crecimiento en medios no fermentables como el glicerol, ya que la respiración no se puede llevar a cabo al carecer estas estirpes de coenzima Q. Ejemplos de esto son la estirpe nula en *COQ2* (López-Martín et al., 2007), la estirpe nula en *COQ4* (Casarin et al., 2008) o la estirpe nula en *COQ7* (Sergio Padilla et al., 2004). Por tanto, quisimos observar el comportamiento tanto de la estirpe nula en *YPL109c*, como del resto de estirpes generadas en el punto anterior en cuanto al crecimiento tanto en YPD como en YPG

A



B

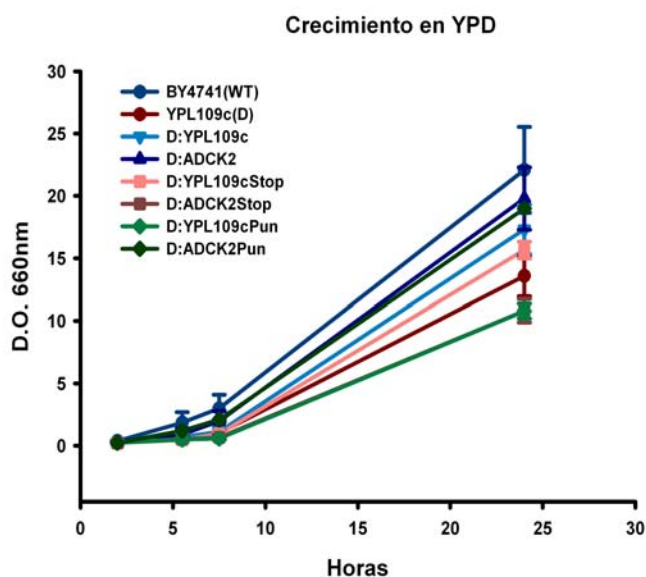
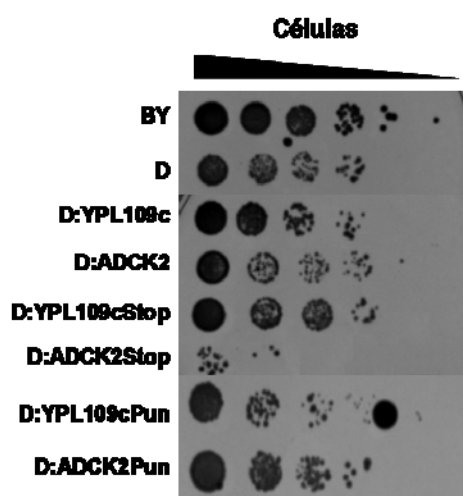


Figura 26. Crecimiento de las estirpes de levadura en un medio con glucosa como fuente de carbono (YPD). **A)** Crecimiento en placa de YPD de las estirpes generadas en 2.1.2. Las levaduras se cultivaron 48 horas en glucosa (medio SD-ura) tras las que se sembraron 3 μ l en diluciones seriadas de 1/10 partiendo de una concentración de $D.O_{660nm}=2$ **B)** Crecimiento en medio líquido YPD de las estirpes generadas en 2.1.2. Las levaduras se cultivaron 48 horas en glucosa (medio SD-ura) tras las que se sembraron en medio YPD a una concentración inicial de $D.O_{660nm}=0.2$

En la figura 26 podemos observar el crecimiento de las estirpes en un medio (YPD) con una fuente de carbono fermentable como es la glucosa. En este caso, todas las estirpes son capaces de crecer en este medio, aunque el crecimiento es desigual, ya que las estirpes que sobreexpresan las mutaciones y la estirpe nula (excepto en el caso de D:ADCK2Pun), alcanzan una $D.O_{660nm}$ en torno a 10, mientras que el resto de estirpes alcanzan un valor medio de $D.O_{660nm}$ en torno a 17. Por tanto, aunque la mayoría de las estirpes que sobreexpresan mutaciones y la estirpe nula pueden crecer usando el metabolismo fermentativo, se observa que hay una alteración en el “*fitness*” del crecimiento que impide que dichas estirpes alcancen, en términos absolutos, los valores de $D.O_{660nm}$ que alcanzan la estirpe WT y las que sobreexpresan las proteínas silvestres.

A



B

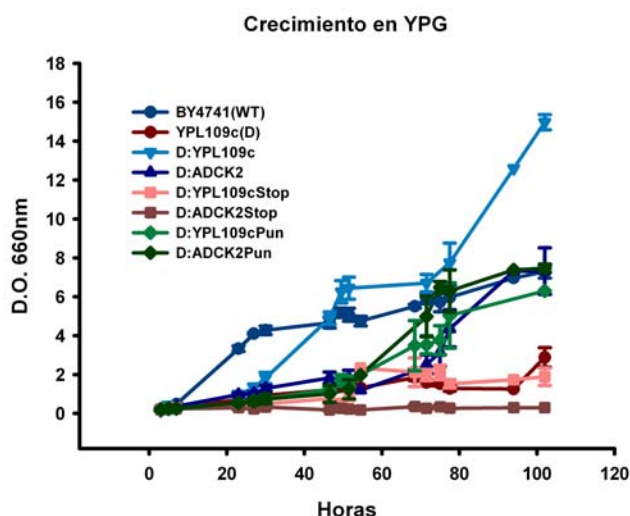


Figura 27. Crecimiento de las estirpes de levadura en un medio con glicerol como fuente de carbono (YPG). A) Crecimiento en placa de YPG de las estirpes generadas en 2.1.2. Las levaduras se cultivaron 48 horas en glucosa (medio SD-ura) tras las que se sembraron 3 μ l en diluciones seriadas de 1/10 partiendo de una concentración de D.O_{660nm}=2 **B)** Crecimiento en medio líquido YPG de las estirpes generadas en 2.1.2. Las levaduras se cultivaron 48 horas en glucosa (medio SD-ura) tras las que se sembraron en medio YPG a una concentración inicial de D.O_{660nm}=0.2

En la Figura 27 observamos el crecimiento de las estirpes en un medio con una fuente de carbono no fermentable como es el glicerol (YPG), y observamos que la estirpe D es capaz de crecer en glicerol y, por tanto, de tener un metabolismo aerobio. Sin embargo, a pesar de crecer en glicerol, el crecimiento en YPG de la estirpe D es menos robusto que el de la estirpe WT, ya que tiene un crecimiento menor y más retardado en el tiempo. Esto nos está indicando que la carencia de *YPL109c* está afectando negativamente al metabolismo aerobio, algo que era de esperar, ya que la estirpe D tiene un déficit de CoQ₆. En cuanto a las estirpes complementadas con *YPL109c* y *ADCK2*, observamos una mejora del crecimiento en YPG respecto a la estirpe D, sobre todo en D:YPL109c, que en la curva de crecimiento incluso alcanza valores superiores a la de la estirpe WT, probablemente por efecto de la sobreexpresión de la proteína endógena. Por el contrario, las estirpes con las mutaciones de los pacientes tienen un crecimiento más retardado que el WT, aunque las estirpes con la mutación puntual son capaces de crecer mejor que la estirpe D, quizás debido a que la mutación

puntual afecta, pero no anula completamente la función de la proteína y por tanto, la respiración siempre funcionará mejor con un elemento que funcione mal que con la carencia de ese elemento. Especialmente crecen mal en YPG las estirpes con la mutación con el codón de Stop que da lugar a una proteína truncada muy posiblemente no funcional. Incluso la estirpe D:ADCK2Stop prácticamente no es capaz de crecer en YPG, sugiriéndonos que quizás la sobreexpresión de esta proteína truncada podría tener un efecto negativo adicional sobre la estirpe D, provocando un empeoramiento de D:ADCK2Stop respecto a la estirpe D.

Vemos como la estirpe nula en *YPL109c* se comporta de forma diferente a las estirpes nulas citadas anteriormente como ejemplos (*COQ2*, *COQ4* o *COQ7*), ya que éstas no son capaces de crecer en YPG debido a la carencia total de CoQ₆ que tienen. La estirpe D tiene un déficit del 40% en la cantidad de CoQ₆ y es capaz de crecer en YPG, pero de forma mucho más lenta y en menor cantidad que el WT. Esto nos está sugiriendo que *YPL109c*, al igual que su gen ortólogo *ADCK2*, estaría implicado en la ruta de síntesis del coenzima Q, pero que no llevaría a cabo uno de los pasos catalíticos de la ruta, ya que si esto fuera así la estirpe D tampoco tendría CoQ₆. *YPL109c* sería, por tanto, como ya hemos discutido con *ADCK2*, un elemento regulador de la ruta de síntesis del coenzima Q, cuya carencia provoca un déficit moderado de coenzima Q afectando al metabolismo aerobio de la levadura, pero no anulándolo.

2.1.4. Determinación de actividades de la cadena respiratoria

Además de medir la cantidad de coenzima Q, y el crecimiento en medios con fuentes de carbono fermentables y no fermentables; quisimos estudiar la funcionalidad del metabolismo respiratorio estudiando el estado de los complejos de la cadena respiratoria en estas estirpes de levadura (Figura 28). La medida de los complejos de la cadena respiratoria (ver punto 6.12 de Materiales y Métodos) se realizó a partir de mitocondrias purificadas el mismo día de la medida (ver punto 6.7.1 de Materiales y Métodos).

Tras medir la actividad del complejo I pudimos observar una disminución de ésta en todas las estirpes respecto al WT de un 60% aproximadamente de media. En

cambio no se detectaron cambios significativos en la actividad del complejo III, solo una leve disminución, excepto en D:ADCK2Stop con una disminución del 50%.

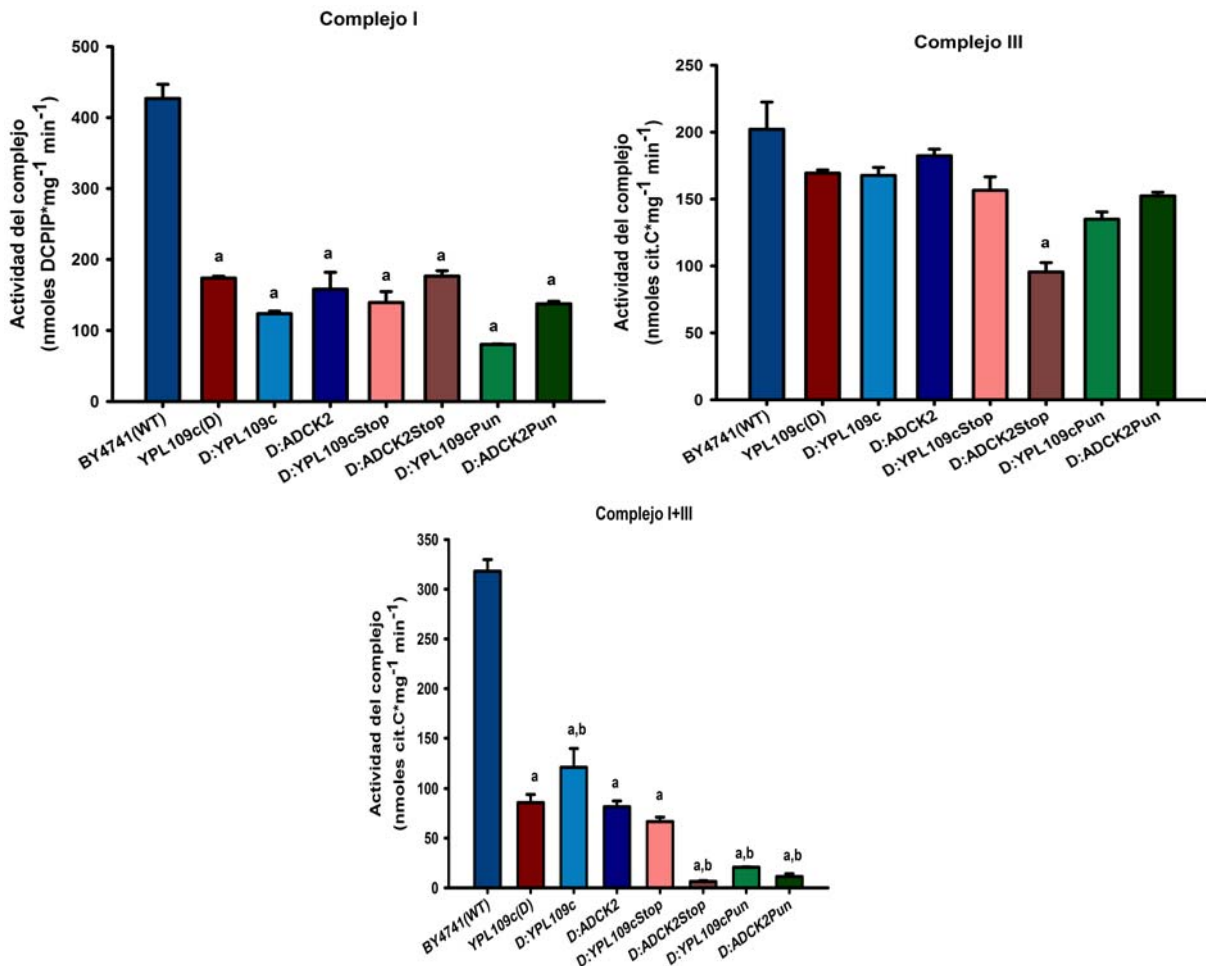


Figura 28. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria en las estirpes generadas para la complementación. La actividad de cada complejo se cuantificó a partir de 50µg de proteína de mitocondria cruda purificadas el mismo día de la medida. Diferencias respecto a WT a=P<0,01. Diferencias respecto a D b=P<0,01.

Al medir la actividad de los complejos I y III conjuntamente es donde observamos una mayor disminución de la actividad, siendo de casi el 70% en D respecto al WT. La actividad es aún mucho menor en las estirpes que sobreexpresan *YPL109c* o *ADCK2* con las mutaciones de los pacientes, excepto D:YPL109cStop, reduciendo la actividad entre un 70% y un 90% respecto a la estirpe D y más del 90% respecto al WT. De forma contraria, la estirpe D:YPL109c recupera parte de la actividad al aumentar casi un 40% respecto a la estirpe D.

Con estos datos observamos que fundamentalmente el complejo que se encuentra afectado en la estirpe D es el complejo I, aunque el complejo III tenga una actividad levemente inferior. Al contrario de lo que sucede con la cantidad de coenzima Q, no ha habido una complementación de la actividad del complejo I ni I+III, excepto en el caso de D:YPL109c en el complejo I+III, donde se recupera parte de la actividad respecto a la estirpe D. Sin embargo, de forma general, las estirpes que sobreexpresan las versiones mutadas de *YPL109c* y *ADCK2* tienen una actividad de los complejos disminuida respecto a la estirpe D. Esto podría ser debido a que la sobreexpresión de una proteína mutada estuviera afectando negativamente a estas estirpes como ya hemos apuntado en el punto anterior al comentar el crecimiento en YPG de D:ADCK2Stop, que es aun menor que el de la estirpe D.

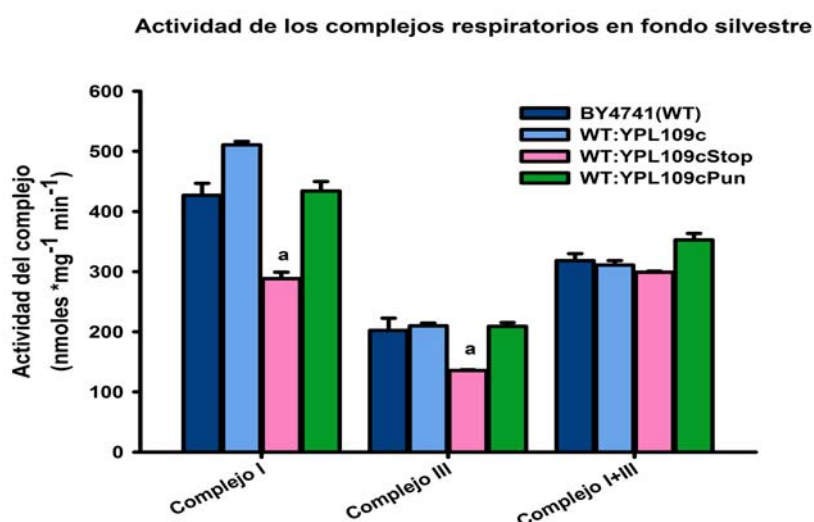


Figura 29. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria en estirpes con todas las versiones de *YPL109c* sobre fondo silvestre utilizadas en la complementación. La actividad de cada complejo se cuantificó a partir de 50 µg de proteína de mitocondria cruda purificadas el mismo día de la medida. a=p<0.01

Para ver si la sobreexpresión en general y la sobreexpresión de proteínas mutadas en particular estaban afectando negativamente a los complejos en estas estirpes, medimos la actividad de los complejos tras sobreexpresar las versiones de *YPL109c* en una estirpe WT en vez de en una estirpe D (Figura 29).

Con la sobreexpresión de la proteína *YPL109c* (WT:YPL109c) no observamos un efecto negativo sobre la actividad de los complejos respiratorios, es más, la sobreexpresión aumenta levemente la actividad del complejo I, de igual forma que lo hace al sobreexpresarla en la estirpe D (D:YPL109c) en el complejo I+III. Por tanto

descartamos el posible efecto negativo sobre los complejos de la sobreexpresión de una proteína funcional. Al sobreexpresar *YPL109c* con la mutación puntual (WT:*YPL109c*Pun) tampoco observamos un efecto negativo sobre la actividad de los complejos, pero esto si lo observamos al sobreexpresar *YPL109c* con el stop prematuro (WT:*YPL109c*Stop), ya que hay una disminución cercana al 40% tanto en la actividad del complejo I como del III. Por tanto, la sobreexpresión de una proteína truncada parece tener un efecto negativo sobre la actividad de los complejos I y III. Esto podría explicar el, a veces, peor comportamiento de D:*YPL109c*Stop y sobre todo de D:*ADCK2*Stop respecto a la estirpe D, tanto a nivel de actividades de los complejos como el III y I+III, como del peor crecimiento en YPG.

Podemos concluir que la estirpe D tiene una disminución en la actividad del complejo I y I+III respecto al WT debido a un mal funcionamiento del complejo I. Este defecto en la actividad de la cadena respiratoria sólo es recuperado, en parte, al sobreexpresar *YPL109c* a nivel de la actividad de I+III, pero no en el complejo I, y no al sobreexpresar *ADCK2*. La falta de una recuperación total de la actividad en D:*YPL109c* y más evidente en D:*ADCK2* no puede ser explicada por un efecto negativo propio de la sobreexpresión proteica. Contrariamente a lo que ocurre con el contenido de coenzima Q en estas estirpes, no hay una complementación evidente de las actividades de los complejos I y I+III al sobreexpresar *YPL109c* y *ADCK2*, tan solo el citado aumento de un 40% en la actividad del complejo I+III en D:*YPL109c*. Esto nos sugiere que *YPL109c* y también *ADCK2* no estarían implicados directamente en la funcionalidad de la cadena respiratoria y si en la biosíntesis del coenzima Q. Es decir, al complementar con ambos genes prácticamente recuperamos el nivel de coenzima Q del WT, pero apenas mejoramos levemente la actividad del I+III de la cadena respiratoria y solo al complementar con el gen de levadura. Todo indica a que *YPL109c* y *ADCK2* serían un elemento regulador de la ruta de síntesis del coenzima Q, y que defectos en ellos disminuirían la cantidad de coenzima Q, afectando a la actividad de la cadena respiratoria y más indirectamente aún, en humanos, a la β -oxidación. Tras esto quisimos averiguar si en levadura también se veía afectada la β -oxidación como ocurre en células humanas.

2.1.5. Determinación de la β -oxidación

Además de cuantificar la cantidad total de CoQ₆ en las estirpes de levadura, quisimos evaluar la actividad de la β -oxidación de los ácidos grasos para ver si existía un paralelismo con la deficiencia encontrada en los fibroblastos de pacientes con mutaciones *en ADCK2*. Medimos esta actividad en las estirpes silvestre y nula para *YPL109c* (Figura 30).

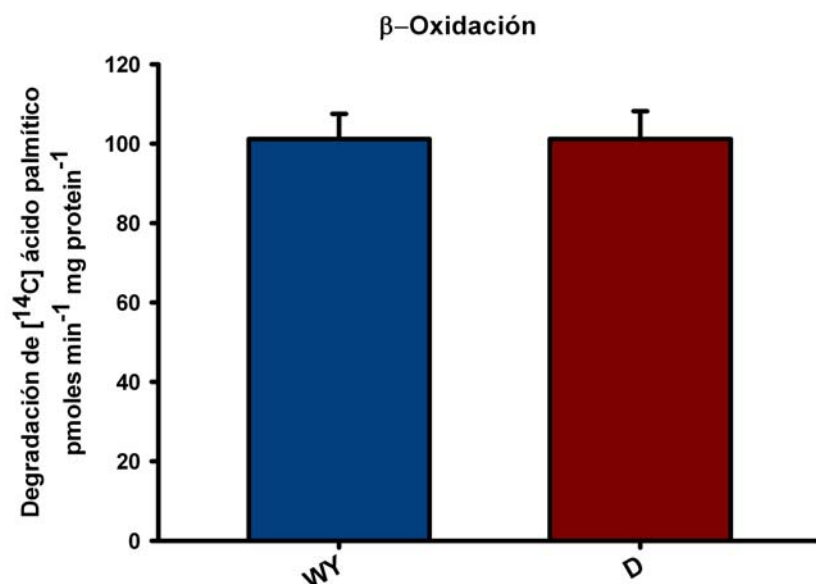


Figura 30. Medida del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos. A partir de un cultivo de 48 horas en SD-Ura, se rompieron las células con bolas de vidrio y midió la actividad en el homogenado. Para calcular la actividad del ciclo se añadió [¹⁴C]ácido palmítico y se determinó su nivel de degradación tras medir las fracciones soluble (con el ¹⁴C proveniente de su degradación) y no soluble (con el [¹⁴C]ácido palmítico no degradado) en el contador de centelleo.

No se pudo observar ningún defecto en la β -oxidación en la estirpe nula respecto a la silvestre. Esto puede ser debido a que en *Saccharomyces cerevisiae*, al contrario que en células humanas, el proceso de la β -oxidación no ocurre en la mitocondria, si no que ocurre en los peroxisomas (Lockshon, Surface, Kerr, Kaeberlein, & Kennedy, 2007) y no requiere el coenzima Q como aceptor de electrones (Hiltunen et al., 2003). La degradación de los ácidos grasos en levadura sería ajena a la mitocondria y, por tanto, un mal funcionamiento general de ésta, como hemos observado en los fibroblastos de pacientes, no afectaría a la actividad del ciclo de la β -oxidación, como si ocurre en células humanas.

2.2. Silenciamiento y sobreexpresión transitoria de ADCK2 en células MRC5

Como alternativa a la complementación en levaduras para abordar la implicación de *ADCK2* en la ruta de síntesis del coenzima Q, se midieron diversos parámetros relacionados tras modificar la expresión de *ADCK2* mediante silenciamiento o sobreexpresión transitoria en la línea celular MRC5.

2.2.1. Contenido de coenzima Q

El primer parámetro que quisimos medir en las células MRC5 fue el contenido total de CoQ₁₀. Para esto silenciamos y sobreexpresamos transitoriamente *ADCK2* en células MRC5 como se indica en el punto 4.3 del apartado Materiales y Métodos. Para el silenciamiento se utilizó un siRNA comercial y para la sobreexpresión la construcción pcDNA-*ADCK2* cuya obtención se indica en el punto 5 del apartado Materiales y Métodos.

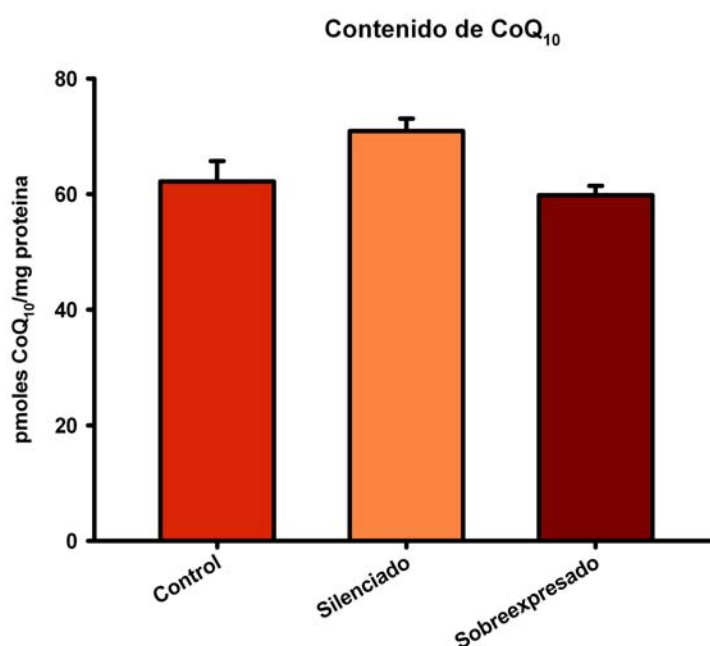


Figura 31. Contenido de CoQ₁₀ en células de la línea MRC5 donde se ha silenciado o sobreexpresado transitoriamente *ADCK2*. Tras cultivar un mínimo de 72 horas, las células MRC5 se sometieron al silenciamiento transitorio de *ADCK2* durante 144 horas por siRNA o a su sobreexpresión transitoria con el plásmido pcDNA durante 48 horas. Frente a la expresión 1(u.a.) del control, la sobreexpresión de *ADCK2* fue de $4,99 \pm 1,98$ (u.a.) y tras el silenciamiento de 0.2 ± 0.06 (u.a.).

En la figura 31 podemos observar que no hay una variación significativa de la cantidad de CoQ₁₀ en las células MRC5 tras el silenciamiento o la sobreexpresión transitoria de *ADCK2*. Hay que tener en cuenta que tras el silenciamiento o sobreexpresión a nivel de ARNm, esto debe tener efecto más tarde a nivel proteico, y

una vez que el nivel de proteína disminuye, el efecto del silenciamiento se debería trasladar a la ruta de síntesis de CoQ₁₀. Finalmente, una vez que la ruta está afectada, el nivel de CoQ₁₀ debería disminuir poco a poco. Todo este proceso unido a que el CoQ₁₀ es bastante estable, nos hace pensar que con las 48 horas de la sobreexpresión o las 144 horas del silenciamiento de *ADCK2*, puede que no sea tiempo suficiente para ver variaciones a nivel de la cantidad total de CoQ₁₀.

2.2.2. Tasa de síntesis de CoQ₁₀ por incorporación de [¹⁴C]pHB

Una vez que hemos observado que los niveles de CoQ₁₀ no varían significativamente probablemente por la corta duración del tratamiento, nos propusimos cuantificar la tasa de síntesis de CoQ₁₀ por incorporación de [¹⁴C]pHB. Variaciones en la tasa de síntesis del CoQ₁₀ deben observarse antes en el tiempo que variaciones en la cantidad total de CoQ₁₀.

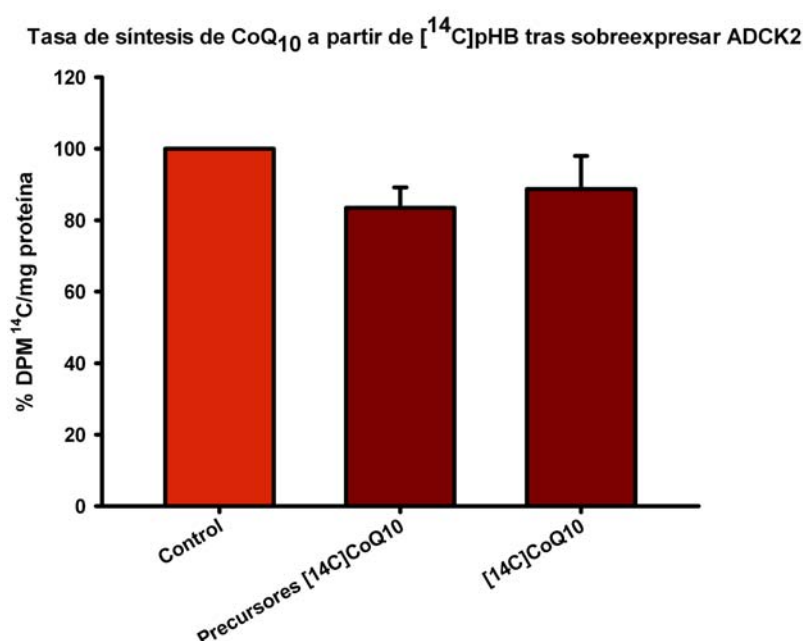


Figura 32. Tasa de síntesis de CoQ₁₀ a partir de [¹⁴C]pHB en células MRC5 tras sobreexpresar *ADCK2*. A partir de células de la línea MRC5 que fueron cultivadas un mínimo de 72 horas, se sembraron 6 placas de 60mm en las que se sobreexpresó temporalmente durante 48 horas *ADCK2* mediante la construcción pcDNA-*ADCK2*. Precursores de [¹⁴C]CoQ₁₀ se refiere al total de compuestos marcados con ¹⁴C, derivados del [¹⁴C]pHB, excluyendo el [¹⁴C]CoQ₁₀. 5 placas se destinaron a la cuantificación de la tasa de síntesis y 1 a la cuantificación de la expresión. Frente a la expresión 1(u.a.) del control la sobreexpresión de *ADCK2* fue de 8.85 ± 1.97 (u.a.).

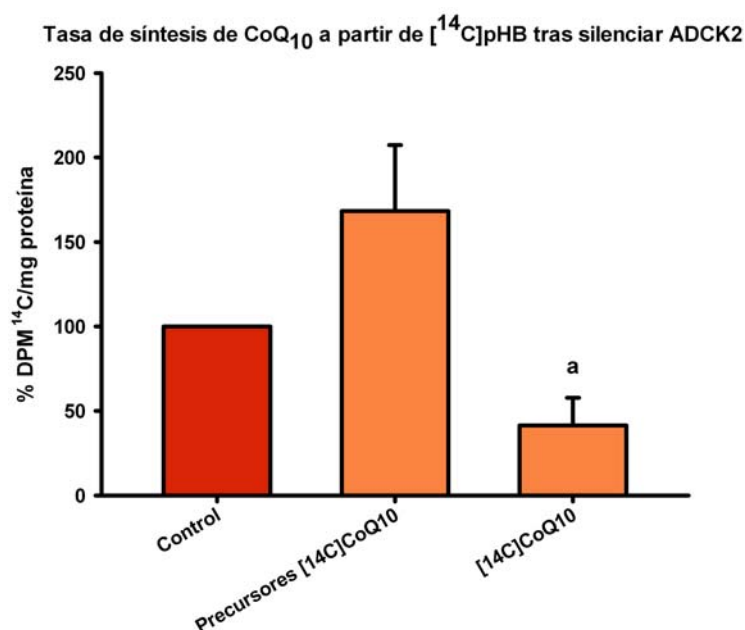


Figura 33. Tasa de síntesis de CoQ₁₀ a partir de [¹⁴C]pHB en células MRC5 tras silenciar ADCK2. A partir de células de la línea MRC5 que fueron cultivadas un mínimo de 72 horas, se sembraron 6 placas de 60mm en las que se silenció temporalmente ADCK2 durante 144 horas mediante siRNA. Precursores de [¹⁴C]CoQ₁₀ se refiere al total de compuestos marcados con ¹⁴C, derivados del [¹⁴C]pHB, excluyendo el [¹⁴C]CoQ₁₀. 5 placas se destinaron a la cuantificación de la tasa de síntesis y 1 a la cuantificación de la expresión. Frente a la expresión 1(u.a.) del control la expresión de ADCK2 tras el silenciamiento fue de $0.035 \pm 5e^{-3}$ (u.a.). $a=P<0.05$

Tras sobreexpresar transitoriamente ADCK2 con la construcción pcDNA-ADCK2 no observamos variaciones significativas en la tasa de síntesis de CoQ₁₀ (Figura 32), algo que si observamos tras silenciar transitoriamente ADCK2 (Figura 33). Tras el silenciamiento de ADCK2 se puede observar como la tasa de síntesis se ve afectada negativamente, al disminuir un 59% respecto del control, y paralelamente aumentan los compuestos derivados del [¹⁴C]pHB que no son [¹⁴C]CoQ₁₀ en un 68%. Estos compuestos son intermediarios de la ruta de síntesis del CoQ₁₀.

El silenciamiento y la sobreexpresión de un determinado gen no tienen porque acarrear efectos contrarios y este puede ser un ejemplo. En una célula MRC5, donde la tasa de síntesis del CoQ₁₀ debe ser la adecuada en este tipo celular, la sobreexpresión de un gen no tiene porque aumentar una tasa de síntesis que ya es óptima, ya que ésta depende de muchos otros genes, y aunque haya una mayor cantidad de proteína ADCK2, en algún punto de la ruta de síntesis se producirá un “cuello de botella” impidiendo que ese aumento en ADCK2 se traslade en una mayor tasa de síntesis en unas células sanas. Se podría hacer un paralelismo con la enzima antioxidante

glutación peroxidada. Esta enzima oxida y elimina el H_2O_2 utilizando selenio como cofactor (Lubos, Loscalzo, & Handy, 2011). En una célula con un aporte adecuado de selenio, no por aumentar su cantidad vamos a apreciar un aumento en la detoxificación del H_2O_2 por parte de la enzima. Otra cuestión sería si la sobreexpresión de *ADCK2* se realizara en células deficientes para este gen, donde la recuperación del gen probablemente si acarrearía variaciones en la tasa de síntesis. También hay que tener en cuenta que probablemente *ADCK2* no es un elemento central y catalítico en la ruta de síntesis del CoQ_{10} , por lo que un aumento en su expresión debería afectar indirectamente a la ruta de síntesis en células con algún tipo de defecto en el y, como hemos visto, no tener ningún efecto destacable en células sin deficiencias en la ruta como en las células MRC5.

El silenciamiento transitorio de *ADCK2*, sin embargo, si afecta a la tasa de síntesis del CoQ_{10} . Al prácticamente suprimir transitoriamente la expresión de *ADCK2* (silenciamiento del 97%), la tasa de síntesis del CoQ_{10} se ve afectada negativamente. Esto, además, se ve apoyado al observarse un aumento en la cantidad de compuestos intermediarios de la ruta de síntesis de CoQ_{10} y es, por tanto, una prueba más, en este caso muy directa, de que *ADCK2* es un elemento que tiene una función en la ruta de síntesis del CoQ_{10} .

Llama la atención el diferente comportamiento, en lo que a la tasa de síntesis se refiere, de las células MRC5 con *ADCK2* silenciado transitoriamente, donde disminuye la tasa de síntesis, y los fibroblastos de pacientes con mutaciones en *ADCK2* que vimos en el punto 1.2, donde la tasa de síntesis está aumentada. Debemos tener en cuenta que ambos casos son claramente diferentes.

Los fibroblastos con mutaciones en *ADCK2* son células que de forma continua tienen un mal funcionamiento de la proteína y, por tanto, un déficit permanente en los niveles de CoQ_{10} . Estas células tienen regulado su metabolismo y la expresión de sus genes para adecuarse a esta situación de déficit de CoQ_{10} continuo. Como se ha visto en el apartado 1.7 la mayoría de los genes de la ruta de síntesis (genes *COQ*) tienen aumentada su expresión en un intento de suplir ese déficit. Con ese aumento general en la expresión de los genes *COQ* y al cultivar las células en una situación de exceso de sustrato ($[\text{}^{14}\text{C}]\text{pHB}$), como ocurre cuando medimos la tasa de síntesis de CoQ_{10} , es de

esperar que la tasa de síntesis esté aumentada en este caso al tener ya la célula todos los mecanismos dispuestos para sintetizar más CoQ₁₀ y además tener una necesidad mayor de sintetizarlo. Sin embargo las células de la línea MRC5 tienen una tasa de síntesis de CoQ₁₀ normal y en un momento muy determinado perjudicamos uno de los elementos de esa ruta silenciando *ADCK2*. Es de esperar, por tanto, que la ruta de síntesis se vea afectada negativamente. No es el mismo caso el de las células MRC5 en las que en un momento determinado afectamos negativamente un elemento de la ruta disminuyendo la tasa de síntesis, que células ya adaptadas a ese defecto de forma continua y cuyo metabolismo ya está modulado hacia que la tasa de síntesis de CoQ₁₀ sea lo mayor posible.

Con este dato reafirmamos la conclusión de que *ADCK2* participa en la ruta de síntesis del CoQ₁₀, ya que su silenciamiento lleva a la célula a una menor tasa de síntesis de CoQ₁₀ y, por tanto, aunque el descenso del nivel de CoQ₁₀ no se pudo apreciar en el apartado 2.2.1 debido a la transitoriedad del tratamiento, con el tiempo, en última instancia, tiene que llevar a una menor cantidad de CoQ₁₀ total, de la misma forma que ocurre en los fibroblastos de los pacientes. Probablemente *ADCK2* se trate de un elemento regulatorio (como discutimos en el apartado 1.2) positivo, ya que su carencia afecta a la ruta de síntesis del coenzima Q disminuyendo su actividad.

2.2.3. Determinación de la β -oxidación

Como hemos visto en el apartado 1.4, la β -oxidación de los ácidos grasos es un proceso que se encuentra afectado negativamente en los fibroblastos de los pacientes con mutaciones en *ADCK2*. Por este motivo quisimos observar el efecto sobre la β -oxidación de variaciones en la expresión de *ADCK2*.

Tras sobreexpresar y silenciar transitoriamente *ADCK2* en células MRC5 no pudimos apreciar variaciones significativas en la β -oxidación de los ácidos grasos (Figura 34) contrariamente a lo que ocurre en los fibroblastos de pacientes.

Puede haber dos causas que expliquen esto y que posiblemente actúen conjuntamente. Por un lado puede ser debido a la transitoriedad del tratamiento y por otro puede ser debido a que *ADCK2* afecta indirectamente a la β -oxidación. Como se explicó en el apartado 2.2.1, de igual forma que tras variar la expresión de *ADCK2* no

observamos variaciones significativas en el nivel total de CoQ₁₀, a diferencia de lo observado en los fibroblastos con mutaciones en *ADCK2*, debido a la corta duración del tratamiento, es de esperar que algo similar ocurriera al medir la β -oxidación. La segunda explicación sería que *ADCK2*, como ya hemos discutido anteriormente, no es una proteína que intervenga directamente en la β -oxidación de los ácidos grasos, por lo que este resultado nos reafirma en esta idea. Solo un defecto permanente en *ADCK2*, como ocurre con los fibroblastos de pacientes, si modularían el metabolismo mitocondrial hacia un defecto en la β -oxidación, no ocurriendo esto con el silenciamiento o sobreexpresión transitoria.

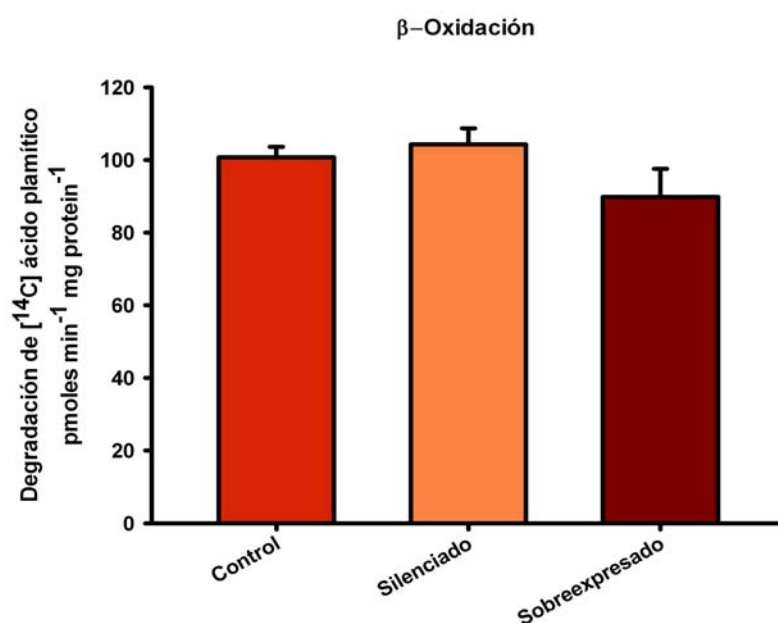


Figura 34. Medida del ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos en células MRC5 tras silenciar y sobreexpresar *ADCK2*. A partir de células de la línea MRC5 que fueron cultivadas un mínimo de 72 horas, se sembraron 6 placas de 60mm en las que se silenció y sobreexpresó temporalmente *ADCK2* mediante siRNA y pcDNA. Para calcular la actividad del ciclo se añadió [¹⁴C]ácido palmítico y se determinó su nivel de degradación tras medir las fracciones soluble (con el ¹⁴C proveniente de su degradación) y no soluble (con el [¹⁴C]ácido palmítico no degradado) en el contador de centelleo. Frente a la expresión 1(u.a.) del control la expresión de *ADCK2* tras la sobreexpresión fue 4.69 ± 0.35 de y tras el silenciamiento fue de 0.023 ± 0.005 (u.a.).

Debemos diferenciar de nuevo, por tanto, un defecto permanente en *ADCK2* en los fibroblastos de pacientes frente a una afectación temporal de *ADCK2* en unas células sanas MRC5. En el primer caso, como ya hemos observado, las células tienen un déficit de CoQ₁₀, una tasa de síntesis aumentada para intentar suplir ese déficit, una

menor actividad de la cadena respiratoria y, como consecuencia indirecta, un descenso en la degradación de ácidos grasos en la β -oxidación. En el segundo caso, no vemos afectados los niveles totales de CoQ₁₀ debido a la corta duración del tratamiento y la alta estabilidad de esta molécula, pero, sin embargo, un proceso más inmediato como el de la incorporación de pHB para la síntesis de CoQ₁₀ si se ve afectado en el tiempo que dura el tratamiento, confirmándonos la implicación de ADCK2 en la ruta de síntesis del CoQ₁₀. Más aún, tanto al medir la tasa de incorporación de pHB al CoQ₁₀, como al medir la tasa de la β -oxidación de los ácidos grasos, estamos midiendo procesos cinéticos y por tanto deberían ser afectados de forma similar en el tiempo. Al no ser así y observar que solo se encuentra afectada negativamente la tasa de síntesis de CoQ₁₀ con el silenciamiento de *ADCK2*, nos reafirmamos en que *ADCK2* está implicado en la ruta de síntesis de CoQ₁₀ y no en la β -oxidación de los ácidos grasos, a la que afecta solo indirectamente.

2.2.4. Niveles de ARNm de los genes de la ruta de síntesis del CoQ₁₀

De igual forma que analizamos la expresión de los genes implicados en la ruta de síntesis del CoQ₁₀ en los fibroblastos de pacientes en el apartado 1.7 quisimos ver que sucedía con la expresión de esos genes tras silenciar y sobreexpresar transitoriamente *ADCK2* (Figura 35).

Tras analizar los resultados de la expresión encontramos resultados dispares. Llama la atención el hecho de que en ningún caso encontramos un gen con una expresión menor que el control tras silenciar o sobreexpresar *ADCK2*. Tan solo encontramos genes que no varían o lo hacen muy poco como *COQ2*, *COQ3* o *COQ7*. Parece que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de *ADCK2* dan lugar al aumento de la expresión general de los demás genes, lo que nos da a entender que la célula respondería a una desregulación en la expresión de *ADCK2* aumentando la expresión de la mayoría de los genes de la ruta de síntesis de CoQ₁₀ como ocurre con *COQ4*, *COQ5*, *COQ8* o *COQ9*.

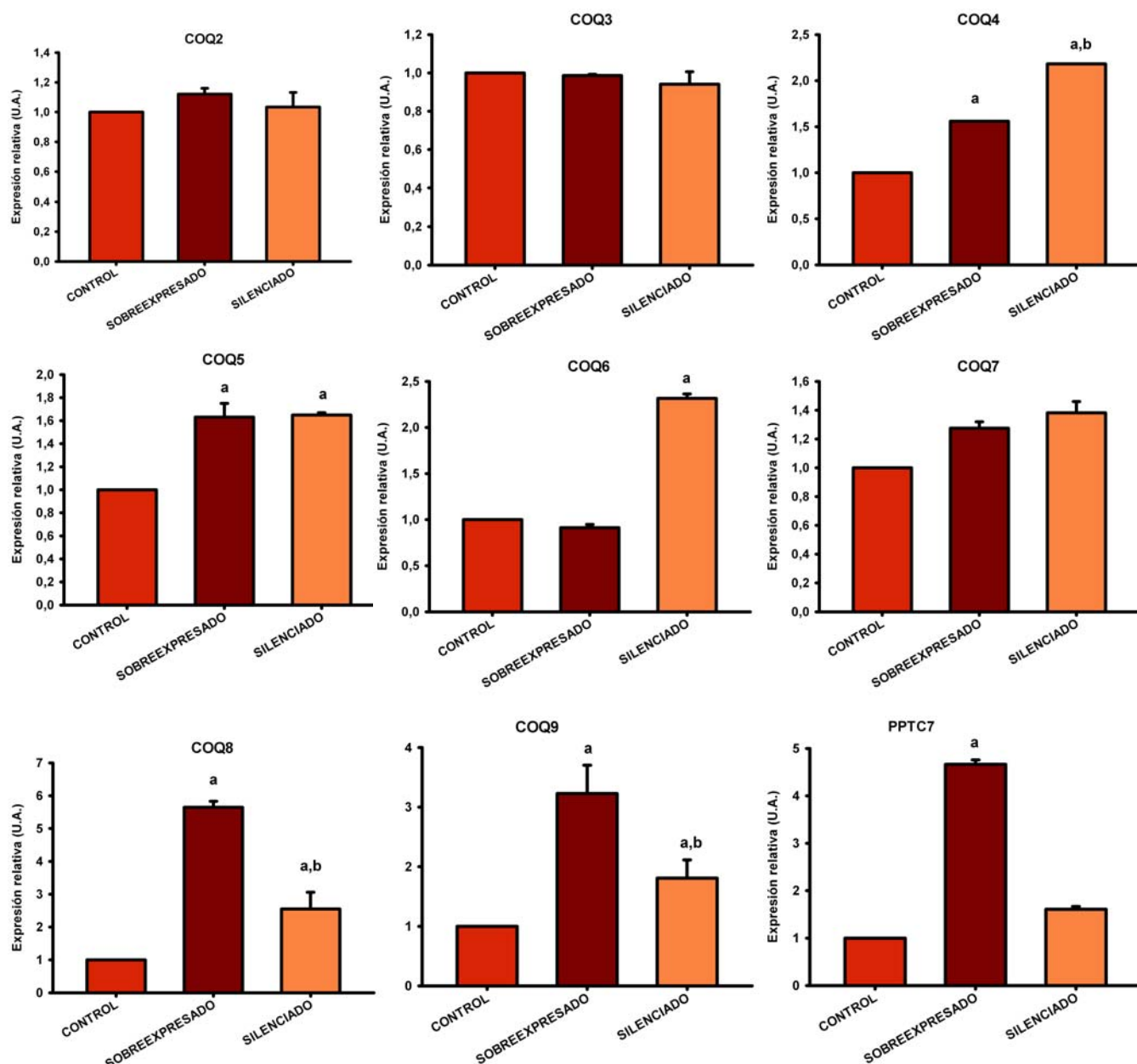


Figura 35. Expresión de los genes *COQ* y *PPTC7* tras silenciar y sobreexpresar transitoriamente *ADCK2* en células MRC5. Niveles de ARNm medidos por PCR a tiempo real en células de la línea MRC5 sometidas a sobreexpresión y silenciamiento de *ADCK2* con el plásmido pcDNA y siRNA respectivamente. Se usaron células MRC5 con niveles endógenos de *ADCK2* como control. Frente a la expresión 1 (u.a.) de *ADCK2* en el control, la sobreexpresión fue de 2.39 ± 0.08 (u.a.) y el silenciamiento de $0.07 \pm 2.54e^{-3}$ (u.a.). a,b=P<0.05 solo se señala cuando la diferencia es mayor a un 50% o menor de un 20% respecto al control.

Sin embargo lo que más llama la atención es la muy alta expresión alcanzada por *COQ8* (casi 6 veces más), *PPTC7* (casi 5 veces) y *COQ9* en menor medida (más de 3 veces) al sobreexpresar *ADCK2*. *PPTC7* es una fosfatasa que desfosforila la proteína Coq7 activándola y favoreciendo la síntesis de CoQ₁₀ (Martin-Montalvo, 2009). Coq8 es una probable quinasa (Xie et al., 2012) que debe fosforilar algún elemento de la ruta de síntesis, regulándola por tanto. Coq9 es una proteína hasta ahora de función desconocida. Debemos tener en cuenta que tanto *PPTC7* como Coq8 son elementos reguladores de la ruta de síntesis (puede que Coq9 también lo sea) y que *ADCK2* lo es también muy probablemente, por lo que parece que el aumento en la expresión de un elemento, *a priori* regulatorio, como *ADCK2*, acarrea un aumento en la expresión de otros elementos regulatorios de la ruta. Esto nos hace pensar que *ADCK2*, *PPTC7* y *COQ8* podrían estar muy relacionados y que podrían actuar de forma conjunta regulando la ruta de síntesis del CoQ₁₀.

3. Caracterización molecular de ADCK2

Una vez que hemos analizado como afectan a nivel celular mutaciones en *ADCK2* y las similitudes que podemos encontrar con el cuadro clínico de los pacientes de los que proceden estas células, nos propusimos caracterizar *ADCK2* a nivel molecular. Analizamos tanto la expresión diferencial que tiene el gen en *Mus musculus*, como la localización subcelular y la función de la proteína.

3.1 Expresión espacio-temporal de *ADCK2* en *Mus musculus*

Tras estudiar los niveles de ARNm de *ADCK2* en los distintos fibroblastos de pacientes en el punto 1.7 del presente apartado, nos pareció interesante realizar un estudio de la expresión de *ADCK2* tanto temporal (a lo largo de los distintos estadios del desarrollo), como espacial (en los distintos tejidos corporales). Al no poder realizar dicho estudio en humanos, optamos por hacerlo en el modelo más cercano posible, *Mus musculus*.

3.1.1 Expresión temporal de *ADCK2* durante el desarrollo de *Mus musculus*

La duración de la gestación en el ratón desde la cópula hasta el nacimiento es de 20-21 días durante los cuales se produce todo el proceso de desarrollo embrionario y fetal. Los primeros 5 días de gestación se consideran como de desarrollo pre-embriónico hasta la formación del blastocisto, mientras que desde el día embriónico (E) E5 al E10 se produce el desarrollo embrionario con la elongación y gastrulación del embrión. Es a partir del E10.5 cuando el embrión empieza el proceso de organogénesis, con la formación de todos los órganos, y se prolonga hasta el E12.5, aunque al llegar al E11.5 la mayoría de los precursores de los órganos del ratón están formados (Moreno-Garcia, Rosenblatt, & Jerome-Majewska, 2012). A partir del E14 hasta el nacimiento se considera que el embrión es ya un feto (Salvadori et al., 2012) y se produce un proceso sobre todo de crecimiento en volumen de los órganos.

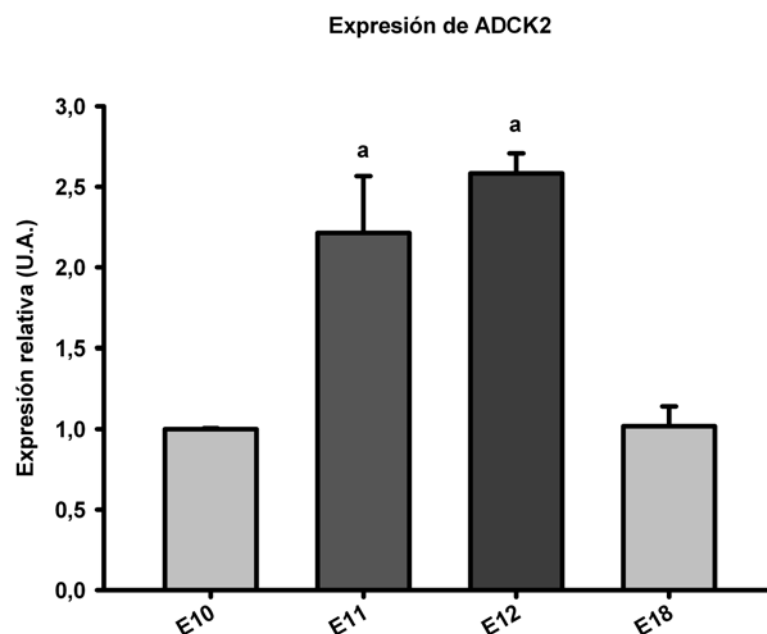


Figura 36. Expresión relativa de *ADCK2* durante el desarrollo embrionario en el ratón. Niveles de ARNm de *ADCK2* detectados por PCR a tiempo real en embriones de ratón a los 10, 11, 12 y 18 días de gestación. $a=P<0.05$

Tras cuantificar los niveles de ARNm de *ADCK2* (Figura 36) observamos que la expresión del gen aumenta de forma considerable durante E11 y E12, con un aumento de hasta 2.5 veces si lo comparamos con E10 o E18. El gen *ADCK2*, por tanto, aumenta su expresión de forma considerable durante el proceso de organogénesis.

Se ha observado en embriones de ratas que durante el proceso de organogénesis entre E10 y E12, se produce la maduración de la membrana interna mitocondrial y que por tanto hay un cambio en ese momento del metabolismo anaeróbico al aeróbico (Shepard, Muffley, & Smith, 1998, 2000). Al ser *ADCK2* un gen implicado en la ruta de síntesis del coenzima Q, es lógico que durante una etapa crucial del desarrollo en la que la cadena respiratoria y la mitocondria tienen una actividad aumentada para apoyar la organogénesis desde un metabolismo aeróbico, la expresión de *ADCK2* aumente de forma considerable. De hecho se ha observado que embriones de ratones homocigotos deficientes en el gen de la ruta de síntesis del coenzima Q, *COQ7*, no sobreviven al llegar a E10.5, cuando se produciría el cambio del metabolismo anaeróbico al aeróbico (Nakai et al., 2001). A partir del E10.5, por tanto, como consecuencia del cambio al metabolismo aeróbico, habría una activación de la cadena respiratoria mitocondrial y por tanto, muy probablemente, un aumento de la síntesis

de coenzima Q a través del aumento de la expresión de genes implicados en la ruta de síntesis como *ADCK2*.

3.1.2 Expresión espacial de *ADCK2* en *Mus musculus*

Tras el estudio de la expresión de *ADCK2* durante el desarrollo embrionario, realizamos el estudio de la expresión en distintos tejidos del animal adulto y no sometido a ningún esfuerzo de tipo físico.

La distribución del coenzima Q es variable en los distintos tejidos corporales. En humanos, encontramos una cantidad máxima de CoQ₁₀ en el corazón con 114 µgCoQ₁₀/g tejido, seguido del riñón (67 µgCoQ₁₀/g tejido), hígado (55 µgCoQ₁₀/g tejido), músculo (40 µgCoQ₁₀/g tejido) y cerebro (13 µgCoQ₁₀/g tejido) (Turunen et al., 2004). Esta distribución de la cantidad de CoQ₁₀ determinada en los tejidos humanos se correlaciona de forma aproximada con los niveles de expresión de *ADCK2* encontrados en estos tejidos en ratón como se observa en la figura 37.

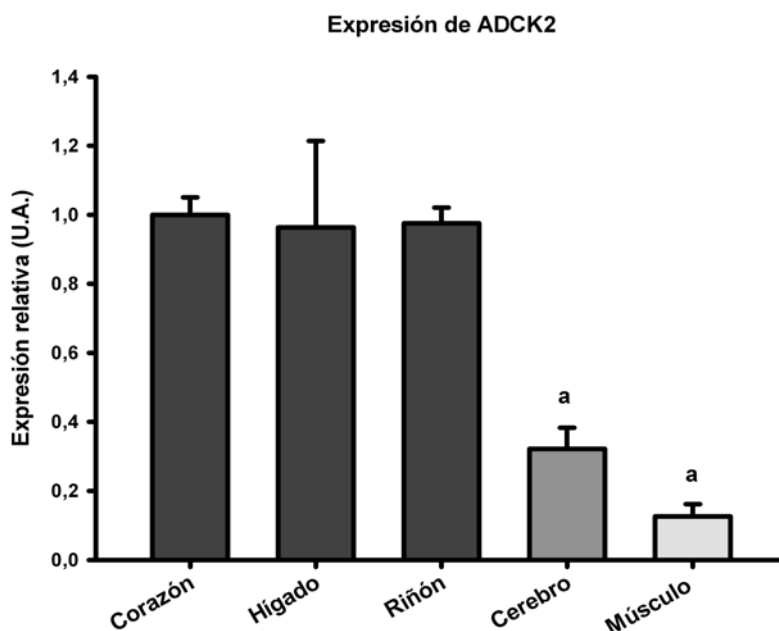


Figura 37. Expresión relativa de *ADCK2* en tejidos de ratón. Niveles de ARNm de *ADCK2* detectados por PCR a tiempo real en distintos tejidos. a=P<0.05

Encontramos una expresión de *ADCK2* máxima en el corazón y mínima en el músculo gastrocnemio, con un descenso de la expresión del 82%. Esto se puede explicar por el diferente metabolismo que encontramos en los dos tipos de músculo. En el músculo cardíaco encontramos un alto requerimiento energético de forma continua, con un metabolismo aeróbico mayoritario y con una alta tasa de β -oxidación de los ácidos grasos, además de un alto contenido en CoQ₁₀. Debido al continuo requerimiento energético, este tejido contiene un alto número de mitocondrias, por lo que es de esperar que un gen implicado en la síntesis del coenzima Q y el metabolismo respiratorio como *ADCK2*, tenga una mayor expresión en este tejido. Por el contrario, el músculo gastrocnemio posee una alta cantidad de fibras musculares de tipo II o blancas (Bryan Dixon, 2009) que son fibras de contracción rápida y que utilizan un metabolismo mayoritariamente anaeróbico a través de la glucólisis. Son fibras musculares con un bajo contenido en mitocondrias, por lo que es de esperar una baja expresión de *ADCK2* en un tejido donde el metabolismo aeróbico no es el predominante. Como se ha comentado antes el contenido de CoQ₁₀, en humanos, es casi tres veces menor en el músculo que en el corazón; de forma análoga observamos que la expresión de *ADCK2* es mucho mayor en el corazón que en el músculo gastrocnemio del ratón. Un indicio más de relación directa entre *ADCK2* y CoQ₁₀.

Hay dos órganos donde los niveles de ARNm de *ADCK2* son similares al corazón, el hígado y el riñón. El hígado es un órgano muy activo metabólicamente y con una gran implicación en el metabolismo lipídico, por lo que no debe extrañarnos que *ADCK2* pueda tener un papel destacado en los hepatocitos. Por su parte, el riñón es curiosamente uno de los órganos más afectados en los casos de pacientes con deficiencia de coenzima Q, de hecho uno de los cinco fenotipos mayoritarios del síndrome de deficiencia de coenzima Q es una nefropatía que puede acabar en fallo renal.

Por último encontramos una expresión disminuida de *ADCK2* en el cerebro respecto a los tres tejidos con una expresión mayor, con una disminución del 68%. El cerebro es un órgano que exclusivamente obtiene la energía de la glucosa y, a veces, de los cuerpos cetónicos, ya que los ácidos grasos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que en el cerebro no hay β -oxidación. El cerebro, al contrario

de lo que podemos encontrar en el músculo gastrocnemio, tiene un metabolismo aerobio, pero, sin embargo, con la baja cantidad de CoQ₁₀ encontrada en humanos en este tejido no debería extrañarnos encontrar una baja expresión de *ADCK2*.

3.3. Localización de la proteína ADCK2

Hasta ahora solo teníamos evidencias bioinformáticas de la localización de la proteína *ADCK2*. Estudios "*in silico*" indicaban una localización mitocondrial de *ADCK2*, como se indica en la base de datos de Uniprot o en la herramienta informática Mitoprot, que arroja un 75% de probabilidad de que *ADCK2* se encuentre en la mitocondria.

Hemos querido comprobar si estos indicios eran correctos localizando *ADCK2* de dos formas, mediante subfraccionamiento celular y mitocondrial y mediante inmunofluorescencia al microscopio confocal.

3.3.1. Inmunofluorescencia y microscopia confocal

El primer intento de localización de la proteína *ADCK2* fue mediante su sobreexpresión en células y el posterior marcaje con anticuerpos y visualización en el microscopio confocal.

La sobreexpresión de *ADCK2* se realizó mediante la construcción pEGFP-*ADCK2* (como se describe en el punto 5.3 de Materiales y Métodos) usando el vector pEGFP-N1. Mediante el uso de este vector podemos sobreexpresar *ADCK2* en fase con EGFP, que se trata de una proteína GFP mejorada para este fin. La transfección del plásmido se realizó en la línea celular HEK293 (punto 4.3.2 de Materiales y Métodos). Una vez sobreexpresado *ADCK2* en fase con EGFP en las células HEK293 se procedió a la fijación y marcaje de las células mediante inmunofluorescencia (punto 6.11 de Materiales y Métodos). Para detectar *ADCK2* se aprovechó el color verde al que fluoresce la proteína EGFP, a la que se encuentra unido *ADCK2*, localizándose, por tanto, en la misma ubicación ambas proteínas. Al suponer, dados los precedentes, que la proteína *ADCK2* tiene una localización mitocondrial, como marcador de ésta se utilizó el anticuerpo anti-TOM20 que se une a la proteína de la membrana externa mitocondrial TOM20. Para el marcaje del núcleo se utilizó el colorante DAPI.

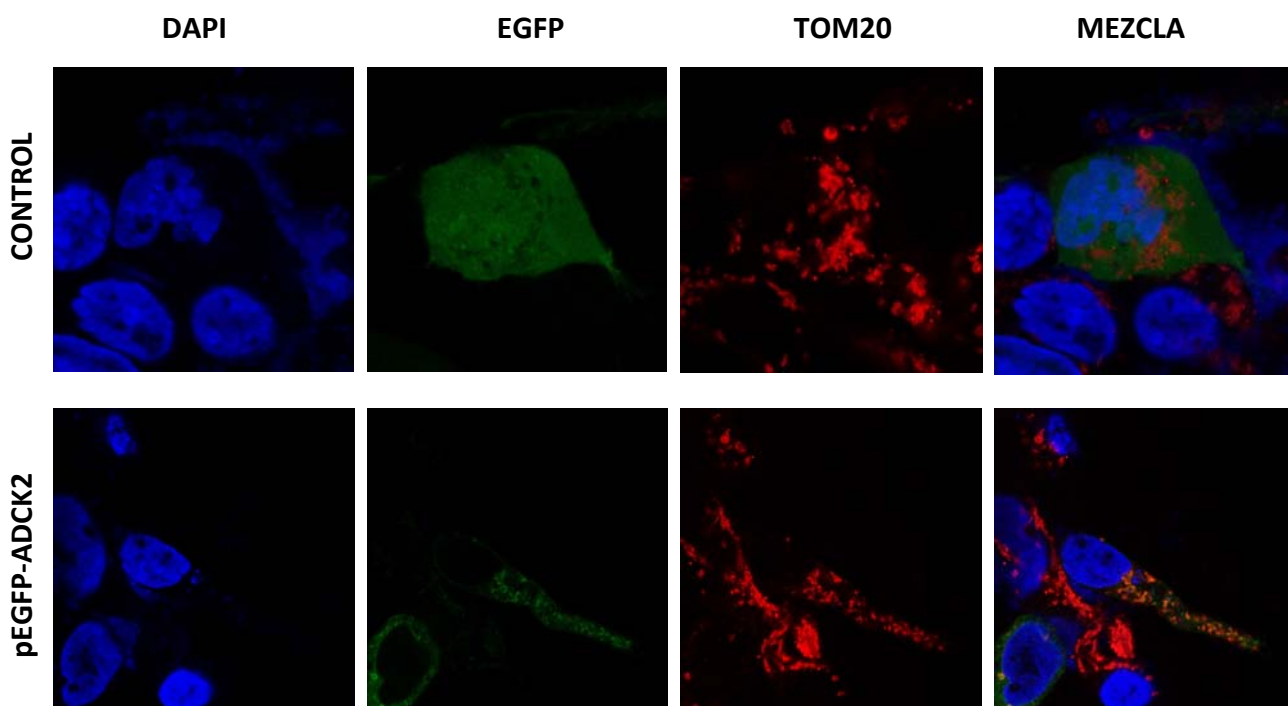


Figura 38. Localización de ADCK2-EGFP por sobreexpresión en el vector pEGFP-N1 en células HEK293 mediante microscopía confocal. Se observa la comparación de la sobreexpresión de ADCK2 unido a EGFP frente al control con el vector pEGFP-N1 que solo sobreexpresa EGFP. Puede observarse, en verde, la localización de EGFP cuando esta unida a ADCK2 (pEGFP-ADCK2) o cuando esta sola (control). En azul se observan los núcleos teñidos con el colorante DAPI y en rojo la red mitocondrial tras el marcaje con el anticuerpo anti-TOM20. En la mezcla podemos observar las tres imágenes anteriores superpuestas. Aumento X253.

Pudimos observar (Figura 38) que la proteína EGFP colocalizaba en gran parte con la proteína TOM20 cuando EGFP se encontraba unida a ADCK2. Contrariamente, cuando EGFP no está unida a ADCK2, la encontramos repartida por toda la célula, incluido el núcleo.

Aunque podemos encontrar ADCK2 fuera de la mitocondria, esto puede ser debido a un efecto propio de la sobreexpresión, al encontrarse la mitocondria ya saturada de ADCK2. Concluimos, por tanto, que la proteína ADCK2, al igual que TOM20, tiene una localización mayoritariamente mitocondrial.

3.3.2. Subfraccionamiento celular y mitocondrial

Como hemos apuntado en el apartado anterior, la sobreexpresión de una proteína es una condición forzada para la célula y puede llevarnos a resultados engañosos al observar su localización al microscopio, ya que la podemos encontrar en

lugares en los que no estaría si su expresión se realizara en condiciones fisiológicas. Por esto intentamos localizar la proteína tras realizar un subfraccionamiento a partir de células humanas HEK293 y también a partir de hígado de ratón (ver punto 6.7.2 y 6.7.3 de Materiales de Métodos) y posteriormente, si conseguimos confirmar su localización mitocondrial, intentar determinar la localización concreta de ADCK2 dentro de la mitocondria degradando selectivamente la mitocondria mediante un ensayo con proteinasa K (punto 6.7.4 de Materiales y Métodos).

Como se observa en la figura 39 A) pudimos localizar ADCK2 en las fracciones enriquecidas en retículo endoplasmático (RE) y en mitocondrias, descartando su presencia en el citosol. Sin embargo este subfraccionamiento en células HEK293 fue parcialmente exitoso, ya que podemos encontrar calnexina, que es una proteína localizada en el RE que atraviesa la membrana una vez (Vandecaetsbeek, Vangheluwe, Raeymaekers, Wuytack, & Vanoevelen, 2011) , en la fracción enriquecida en mitocondrias y paralelamente (aunque en menor grado) encontramos proteína TOM20 exclusiva de la membrana externa mitocondrial en la fracción enriquecida en RE. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es propia del citosol (Jeong et al., 2006) y nos indica que esta fracción está perfectamente purificada y ADCK2 no se encuentra en el citosol. Por tanto con este experimento podemos descartar la presencia de ADCK2 en el citosol pero no sabemos si se encuentra en la mitocondria, en el RE o en ambos.

Uno de los principales problemas al realizar un subfraccionamiento celular es la contaminación de la fracción mitocondrial con vesículas de RE (Rizzuto, Marchi, Zecchini, & Pinton, 2010). Las denominadas como membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) son las membranas del RE que se encuentran asociadas a las mitocondrias, formando una frontera difusa entre ambas organelas y dificultando, por tanto, su completa separación en el proceso de subfraccionamiento. Existía la posibilidad de que ADCK2 se encontrara en las MAMs y que por ese hecho apareciera tanto en la fracción mitocondrial como en la del RE. Una vez vista la dificultad para conseguir unas fracciones más puras partiendo de células en cultivo como material biológico, se realizó un subfraccionamiento a partir de hígado de ratón, donde la separación de las fracciones es más sencilla y la cantidad de material de partida mucho mayor, además de poder purificarse la fracción enriquecida en MAMs.

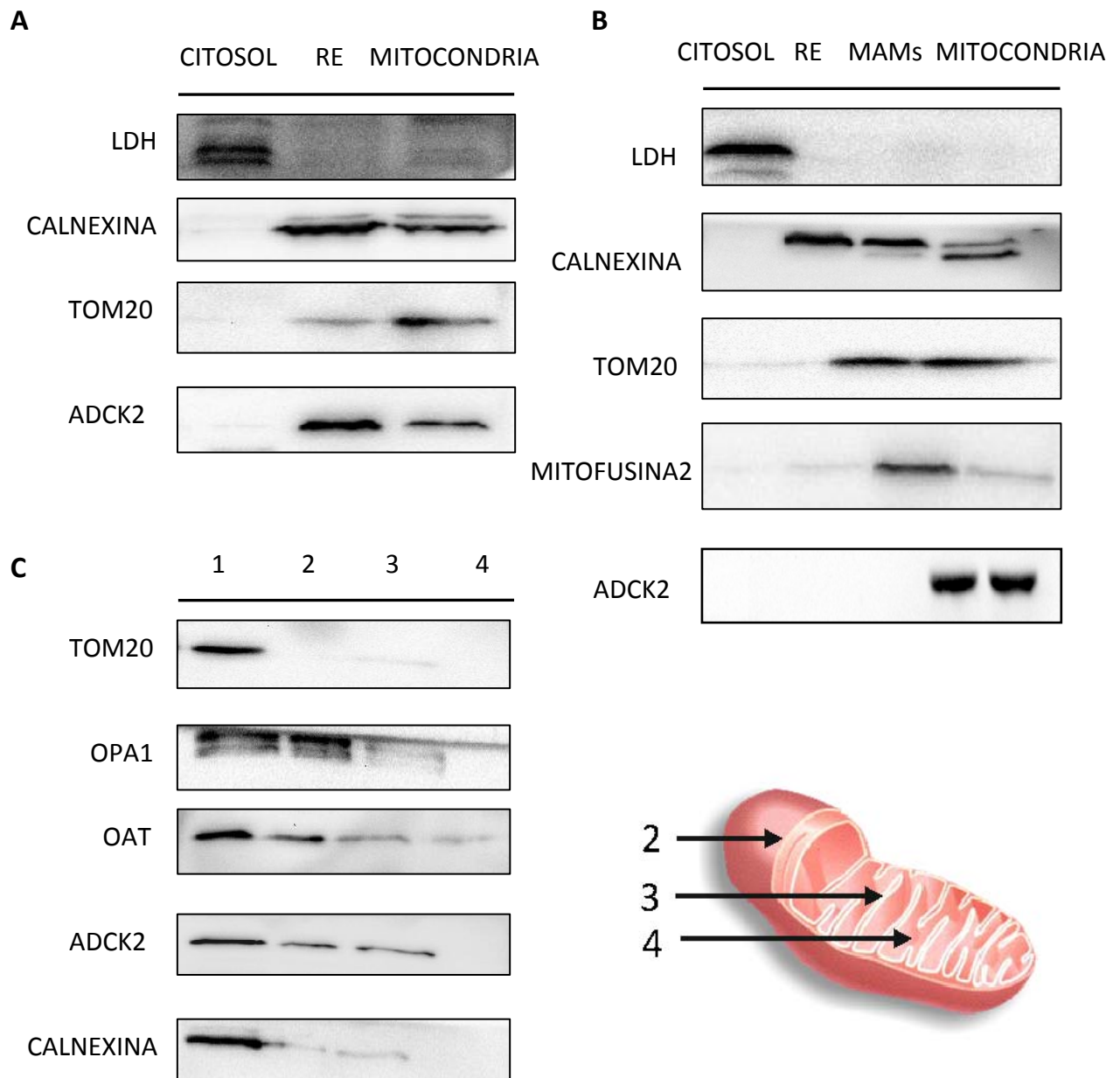


Figura 39. Localización celular y mitocondrial de ADCK2. **A)** Inmunotinción de las fracciones obtenidas a partir del subfraccionamiento celular de células HEK293. Como marcadores se usaron LDH (citósol), calnexina (RE) y TOM20 (mitocondrial). **B)** Inmunotinción de las fracciones obtenidas a partir del subfraccionamiento celular de hígado de ratón. Como marcadores se usaron LDH (citósol), calnexina (RE), TOM20 (mitocondrial) y mitofusina2 (MAMs). **C)** Inmunotinción de las fracciones obtenidas tras someter a la fracción mitocondrial, obtenida a partir de células HEK293, a un tratamiento con proteinasa K. Con el tratamiento con proteinasa K se produjo una degradación secuencial de la mitocondria obteniéndose las fracciones 2 (degradación de las proteínas de la membrana externa mitocondrial), 3 (degradación de las proteínas de la membrana externa mitocondrial, espacio intermembrana y cara externa de la membrana interna mitocondrial) y 4 (degradación de todas las proteínas citadas en 3 y además las de la matriz mitocondrial). 1 es la fracción con las mitocondrias crudas sin tratar con proteinasa K. Como marcadores se usaron TOM20 (membrana externa mitocondrial), OPA1 (membrana interna mitocondrial), OAT (matriz mitocondrial) y calnexina (transmembrana del RE).

En la figura 39 B) podemos observar las fracciones obtenidas tras el subfraccionamiento celular a partir de hígado de ratón. En esta ocasión pudimos purificar una fracción enriquecida en MAMs usando un gradiente de Percoll. Como marcador de MAMs se usó la mitofusina-2, una proteína con un papel central en la fusión mitocondrial e implicada en la modulación de interacciones mitocondria-mitocondria y mitocondria-RE, que aunque se encuentra en la membrana externa mitocondrial, se ha demostrado que las MAMs son regiones enriquecidas en mitofusina-2 (Duarte et al., 2012). La presencia mayoritaria de mitofusina-2 en la fracción enriquecida en MAMs y su presencia también, aunque menor, en la fracción enriquecida en mitocondrias nos indica que la purificación de la fracción MAMs ha sido correcta.

La fracción mitocondrial también se encuentra correctamente purificada, ya que el marcador TOM20 se encuentra en dicha fracción. También aparece en igual grado en la fracción enriquecida en MAMs, algo perfectamente comprensible ya que TOM20 es una proteína de la membrana externa mitocondrial y por tanto debe aparecer arrastrada por los fragmentos de MAMs. Lo importante es que la fracción mitocondrial se ha podido separar por completo de la de RE, ya que TOM20 no aparece en la fracción enriquecida en RE. Lo que si sucede es la presencia del marcador de RE calnexina tanto en la fracción enriquecida en mitocondrias como en MAMs. Esto se explica ya que PACS-2 media en la localización de un *pool* móvil de calnexina hacia MAMs (Simmen, Lynes, Gesson, & Thomas, 2010) pudiéndose encontrarse calnexina en MAMs y, por tanto, pudiéndose contaminar fácilmente la fracción mitocondrial con restos de RE. Por último, la LDH nos indica que la fracción citosólica está perfectamente purificada al encontrarse únicamente en dicha fracción.

Por último, la proteína ADCK2 la detectamos tanto en la fracción mitocondrial como en la fracción enriquecida en MAMs. Definitivamente podemos descartar que ADCK2 se encuentre en el citosol y, ahora también, descartar su presencia en el RE, ya que aunque pudiéramos pensar que ADCK2 aparece en la fracción mitocondrial por la contaminación de RE en dicha fracción que hemos comentado antes, ADCK2 no aparece en la fracción enriquecida en RE, al igual que no aparece el marcador mitocondrial TOM20, quedándonos solo las opciones de que se encuentre en las

MAMs o en la mitocondria o en ambas. ADCK2 aparece en la inmunotinción con la misma intensidad en ambas fracciones, al igual que ocurre con TOM20, mientras que una proteína propia de MAMs como la mitofusina-2 aparece mayoritariamente en MAMs. Esta semejanza de ADCK2 con TOM20 en el perfil encontrado en la inmunotinción, añadido a la débil presencia del marcador de MAMs en la fracción mitocondrial nos indica que ADCK2 se encuentra en la mitocondria, ya que si se encontrara en MAMs su presencia en la fracción mitocondrial debería ser mucho menor. Aún así, aunque podemos concluir que ADCK2 se encuentra en la mitocondria, no podemos descartar al 100% que también podamos encontrarla en MAMs.

Una vez confirmada la localización mitocondrial de ADCK2, realizamos una degradación secuencial de la fracción mitocondrial con proteinasa K (ver punto 6.7.4 de Materiales y Métodos) para determinar en que lugar de la mitocondria se localiza ADCK2 como podemos ver en la figura 39 C).

Frente a la fracción 1, en la que se muestran las mitocondrias crudas, en la fracción 2 realizamos un tratamiento con el que se degradaron las proteínas presentes en la membrana externa mitocondrial. Como era de esperar, la proteína TOM20 fue degradada en este paso, ya que se encuentra en la membrana externa mitocondrial. Como hemos comentado antes, la fracción mitocondrial se encuentra parcialmente contaminada con RE, por lo que incluimos también el marcador de RE, calnexina, en este ensayo y observamos que, al igual que TOM20, también fue degradada en la fracción 2. Aunque se puede observar cierta presencia de calnexina en las fracciones 2 y 3, esto puede ser debido a que, al ser una proteína transmembrana, la degradación puede no ser completa y siempre pueden quedar algunos restos de proteína, que pueden ser reconocidos por el anticuerpo, y mostrar cierta señal en la inmunotinción.

La fracción 3 se corresponde con mitocondrias a las que se les ha sometido a un tratamiento con proteinasa K con el que se han degradado las proteínas de la membrana externa mitocondrial, del espacio intermembrana y de la cara externa de la membrana interna mitocondrial. La proteína atrofia óptica 1 (OPA1) se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial (Zorzano, Liesa, Sebastián, Segalés, & Palacín, 2010) y, por tanto, podemos usarla como marcador en esta fracción. Pudimos observar que OPA1 se encuentra presente en las fracciones 1 y 2, pero desaparece en

3 ya que las proteínas de la membrana interna mitocondrial son degradadas. Sin embargo, OPA1 no desaparece por completo en la fracción 3, posiblemente por la misma razón que comentábamos anteriormente con la calnexina, al ser una proteína transmembrana la degradación puede no ser completa y quedar restos que sean reconocidos por el anticuerpo.

Por último en la fracción 4 se degradan, además de las degradadas en las fracciones 2 y 3, las proteínas de la cara interna de la membrana interna mitocondrial y las de la matriz mitocondrial. La proteína ornitina aminotransferasa (OAT) se localiza en la matriz mitocondrial (Ventura et al., 2010) y nos sirve como marcador en la fracción 4. Aunque en este caso podemos observar como OAT no se degrada al 100% en la fracción 4, posiblemente por una falta de tiempo con el tratamiento con proteinasa K, se puede observar claramente que OAT se degrada a este nivel.

Al analizar la existencia de ADCK2 en las distintas fracciones, observamos que ADCK2 desaparece claramente en la fracción 4, por lo que ADCK2 sería degradada junto con las proteínas de la matriz mitocondrial y la cara interna de la membrana interna mitocondrial.

Tras poner en común todas las evidencias recogidas en este punto 4.3, concluimos que la proteína ADCK2 se encuentra localizada en la mitocondria, sin poder descartar por completo que se pueda encontrar también en MAMs, y que concretamente se encuentra en la matriz mitocondrial o anclada a la cara interna de la membrana interna mitocondrial.

3.4. Función bioquímica de ADCK2

La función concreta que desempeña ADCK2 en la ruta de biosíntesis del coenzima Q es desconocida. Al igual que en el caso de su localización subcelular, únicamente existían indicios basados en estudios bioinformáticos de su secuencia. Estos estudios indican que ADCK2 podría tener una función molecular como quinasa y que podría unir como ligando nucleótidos como el ATP, por lo que nos propusimos indagar en esta supuesta actividad quinasa de ADCK2.

3.4.1. Actividad quinasa de ADCK2

Para testar la posible actividad quinasa de ADCK2 se realizó la purificación de la proteína recombinante en *E.coli* usando como *tag* la proteína GST, a la que se encuentra unida, al no disponer de anticuerpo anti-ADCK2 en ese momento (ver punto 6.4 de Materiales y Métodos).

Una vez purificada la proteína ADCK2-GST se cuantificó su concentración a partir de un gel teñido con plata (ver punto 6.2 de Materiales y Métodos) donde cargamos cantidades conocidas de la proteína BSA, tal y como se muestra en la figura 40 (ver punto 6.5 de Materiales y Métodos). Se determinó que ADCK2-GST se encontraba a una concentración de 0.011 µg/µl en la fracción purificada.

Para estar seguros de que la proteína purificada se trataba de ADCK2-GST se realizó una inmunotinción de la misma con anticuerpo anti-GST y posteriormente, cuando se dispuso de él, con anticuerpo anti-ADCK2 humano (figura 41). Cabe destacar que el tamaño teórico de ADCK2 reflejado en las bases de datos es de 69 kDa, por lo que al añadirle el tamaño del GST de 25 kDa la proteína ADCK2-GST debería aparecer a un tamaño esperado de 94 kDa; sin embargo aparece a un tamaño algo superior a 75 kDa, lo que nos indica que la proteína ADCK2 debe sufrir algún proceso de maduración antes de ser transportada al interior de la mitocondria.

Además de la detección mediante inmunotinción, la banda obtenida como supuesto ADCK2-GST en el gel teñido con plata (y señalada con una flecha en la figura 40) fue recortada y secuenciada mediante espectrometría de masas y análisis MASCOT (como se indica en el punto 6.6. de Materiales y Métodos), arrojando el análisis un

“score” de 376 para la proteína ADCK2, siendo ADCK2 por tanto la proteína que con mayor probabilidad se encuentra en esa banda (para un “score” superior a 81 $P < 0.05$). Confirmamos, por tanto, que la proteína purificada se trataba de ADCK2-GST mediante inmunotinción y mediante espectrometría de masas.

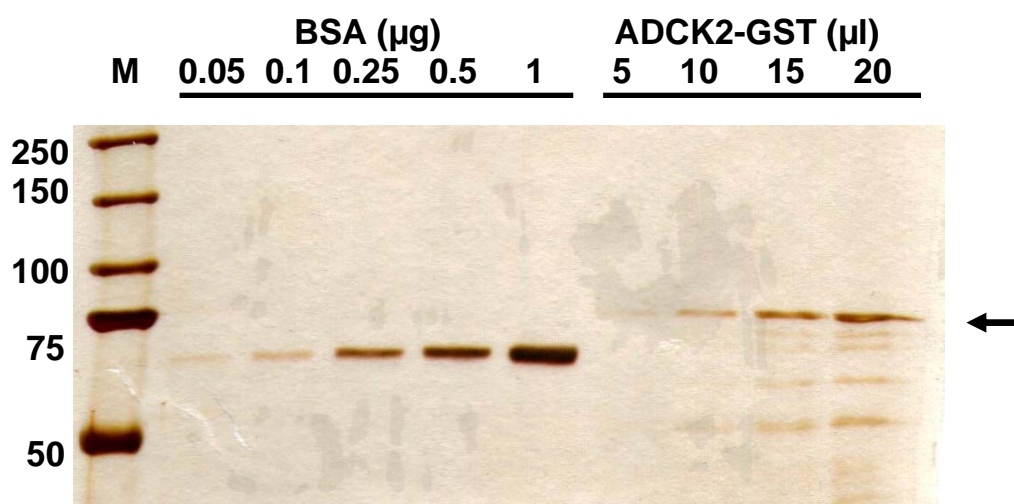


Figura 40. Cuantificación de la proteína recombinante ADCK2-GST a partir de cantidades conocidas de proteína BSA. Gel de acrilamida tras una tinción de plata donde se han cargado volúmenes de proteína purificada ADCK2-GST y cantidades conocidas de BSA. Encontramos la banda de ADCK2-GST a un tamaño aproximado de 75kDa (indicado con una flecha) y el BSA a un tamaño aproximado de 70kDa. Las bandas se cuantificaron con el programa ImageLab y se determinó la concentración de ADCK2-GST a partir de una recta de calibrado generada a partir de la cuantificación de las bandas correspondientes al BSA.

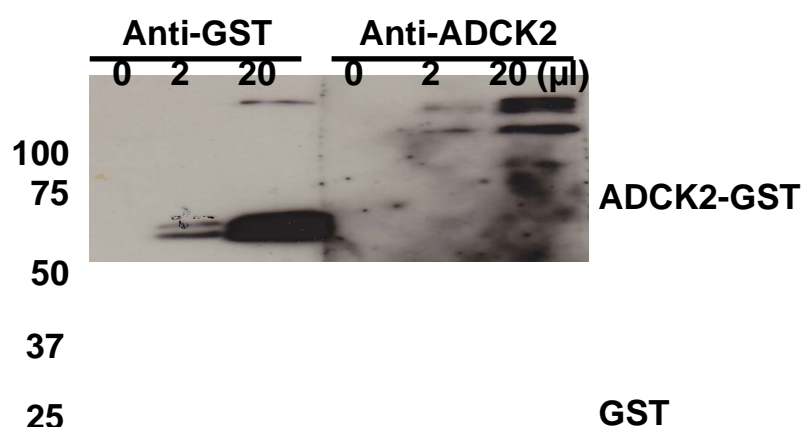


Figura 41. Detección en la fracción purificada de la proteína recombinante ADCK2-GST mediante inmunotinción. Inmunodetección realizada sobre distintas cantidades de ADCK2-GST purificado. Con el anticuerpo anti-GST se detecta una banda a un tamaño aproximado de 25kDa correspondiente con la proteína GST y otra a un tamaño aproximado de 75kDa correspondiente a la proteína ADCK2-GST. Con el anticuerpo anti-ADCK2 se observa una banda a 75kDa aproximadamente correspondiente al ADCK2-GST y una banda inferior a un tamaño ligeramente menor que se puede corresponder a cierta degradación de ADCK2-GST.

Una vez que ADCK2-GST fue purificada, verificada y cuantificada se realizaron diversos ensayos en los que se intentó detectar actividad quinasa usando [32 P]ATP y diversos sustratos que de forma genérica son susceptibles de ser fosforilados (ver punto 6.6 de Materiales y Métodos).

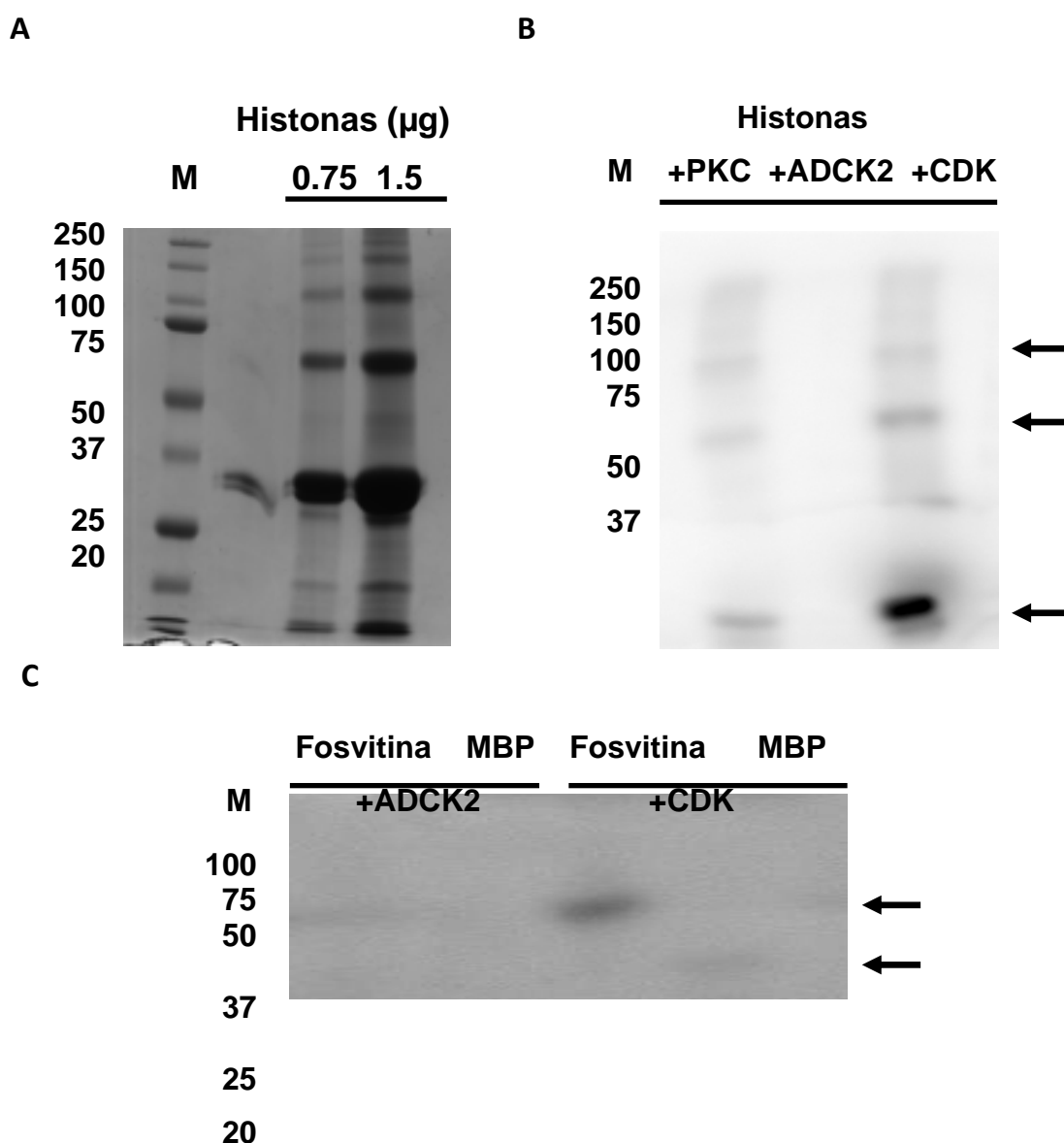


Figura 42. Ensayo quinasa de la proteína recombinante ADCK2-GST. **A)** Tinción con Azul de Coomassie de un gel de acrilamida con distintas cantidades de histonas donde se observa el patrón de bandas de los distintos pesos moleculares de las histonas. **B)** Ensayo quinasa con [32 P]ATP sobre histonas como sustrato fosforilable usando las quinasas comerciales PKC y CDK además de ADCK2-GST. Se señalan con flechas las proteínas fosforiladas **C)** Ensayo quinasa con [32 P]ATP usando fosvitina y MBP como sustratos fosforilables, CDK como quinasa comercial, además de ADCK2-GST. Se señalan con flechas las proteínas fosforiladas.

Como sustratos genéricos susceptibles de ser fosforilados se usaron una mezcla de histonas de distintos tamaños, fosvitina, y proteína básica de la mielina (MBP) (Ubersax & Ferrell, 2007). El peso molecular al que aparece la fosvitina en un gel de acrilamida es de 25 kDa y la MBP bovina a 18,4 kDa. Al usar la mezcla de histonas como sustrato fosforilable, previamente debimos correr dicha mezcla en un gel de acrilamida y teñirlo con Azul de Coomassie para observar el tamaño al que se observan las distintas bandas (Figura 42-A). Una vez conocido el peso molecular de fosvitina y MBP y del patrón de bandas de las histonas, se procedió a realizar el ensayo de la actividad quinasa “*in vitro*” con [^{32}P]ATP sobre las histonas (Figura 42-B) y sobre fosvitina y MBP (Figura 42-C). Como proteínas quinasa control se usaron PKC y CDK. Al realizar el ensayo sobre las histonas, pudimos observar la fosforilación de éstas con ^{32}P cuando usábamos las quinasas control PCK y CDK, pero no observábamos fosforilación al usar ADCK2-GST. Cuando usamos fosvitina y MBP como sustratos fosforilables ocurría la misma situación, la fosvitina aparece fosforilada con ^{32}P a un tamaño aproximado de 25 kDa y parece que la MBP también aparece fosforilada, con una baja señal, a un tamaño de 18 kDa cuando usamos la quinasa comercial CDK, sin embargo la fosforilación no aparece al usar ADCK2-GST.

Con estos resultados, por tanto, no hemos podido detectar actividad quinasa en ADCK2. Hay tres causas que pueden explicar esto. La proteína ADCK2-GST podría ser una quinasa pero no ser funcional, bien porque el GST podría interferir en su función quinasa, o bien porque esta proteína humana puede requerir ciertas modificaciones postraduccionales que al ser producidas en *E.coli* no se llevarían a cabo. Una segunda causa podría ser que ADCK2-GST si tendría actividad quinasa, pero no sobre sustratos genéricamente fosforilables, si no sobre un sustrato específico, y por tanto, al desconocer cuál podría ser no pudimos realizar el ensayo con el. Una tercera causa sería que ADCK2, a diferencia de lo que apuntan las bases de datos, no tuviera actividad quinasa. Existen proteínas que aun teniendo una estructura típica de quinasa carecen de residuos específicos que acarrearán la pérdida de la función quinasa por parte de la proteína. Esto ocurre en alrededor de un 10% del total de proteínas quinasas y se denominan “pseudoquinasas” (Boudeau, Miranda-Saavedra, Barton, & Alessi, 2006). Cabe recordar que ADCK2 es una proteína que pertenece a la familia

ABC1, una familia de quinasas atípicas, por lo que es una buena candidata a ser en realidad una pseudoquinasa.

3.4.2 Función pseudoquinasa de ADCK2

Aproximadamente el 2-3% de los genes en eucariotas codifican para proteínas que contienen un dominio quinasa. Alrededor de un 10% de estas proteínas carecen de uno o varios de los aminoácidos conservados del dominio quinasa y por tanto son catalíticamente inactivas y se denominan pseudoquinasas (Boudeau et al., 2006). En humanos hay descritas 518 proteínas quinasa, 48 de las cuales son consideradas como pseudoquinasas (Manning et al., 2002). Las pseudoquinasas actúan como transductores de señales reuniendo componentes de rutas de señalización, así como activando alostéricamente proteínas quinasa (Zeqiraj & Van Aalten, 2010). Incluso puede haber en una misma proteína un dominio pseudoquinasa que regule un dominio quinasa, como en el caso de las JAKs (Scheeff, Eswaran, Bunkoczi, Knapp, & Gerard, 2009)

Un ejemplo de pseudoquinasa es la proteína STRAD. LKB1 es una quinasa que fosforila y regula la proteína AMPK. La pseudoquinasa STRAD regula la función catalítica de la quinasa LKB1. Esta regulación de LKB1 se produce a través de un mecanismo desconocido e independiente de fosforilación en el cual STRAD adopta una conformación típica de proteína quinasa activa y se une a LKB1 como un pseudosustrato promoviendo la conformación activa de LKB1 (Zeqiraj, Filippi, Deak, Alessi, & Aalten, 2009).

Otro ejemplo es el de la pseudoquinasa VRK3, donde cambios en residuos conservados han incapacitado a la proteína para unir ATP, anulando su ancestral función quinasa. VRK3 es estructuralmente casi idéntica a VRK2, que si es una quinasa, pero con unos pocos cambios en residuos esenciales para la actividad. Sin embargo la proteína se ha conservado en la evolución y parece que hay indicios de que VRK3 se une a la fosfatasa VHR inhibiéndola y afectando, por tanto, a la ruta de señalización de las MAP quinasa (Scheeff et al., 2009; Zeqiraj & van Aalten, 2010).

La proteína ADCK2 pertenece a la familia de quinasas atípicas ABC1 que consta de cinco miembros en humanos, del ADCK1 al ADCK5. De estas presuntas quinasas, a día de hoy, solo se ha demostrado por métodos indirectos la actividad quinasa de ADCK3, ya que al sobreexpresarla en la estirpe nula *COQ8* de levadura se recuperan versiones fosforiladas de Coq3p, Coq5p y Coq7p (Xie et al., 2012). La familia ABC1, dada sus particularidades estructurales, se encuentran clasificadas en un grupo específico dentro del quinoma no relacionado con los demás grupos de quinasas. Como acabamos de comentar, las pseudoquinasas son proteínas que han sustituido residuos esenciales en su dominio quinasa perdiendo la capacidad de fosforilar. De los 12 motivos que podemos encontrar como máximo en una quinasa típica, en ADCK3, por ejemplo, encontramos la presencia de 5 de ellos y en 3 de estos encontramos cambios de residuos respecto a la secuencia consenso (Catarina M Quinzii et al., 2008). Tras analizar la secuencia de ADCK2 y los demás miembros de la familia ABC1, además de YPL109c, observamos que todos los miembros de la familia ABC1 tienen prácticamente los mismos motivos en el dominio quisasa y casi con los mismos cambios en sus residuos (Figura 43). Tan solo el motivo del subdominio VII que está presente en ADCK3 y ADCK4 no se encuentra en los demás miembros.

Centrándonos en ADCK2, observamos como de los cuatro motivos de los subdominios quinasa que contiene, en tres de ellos podemos encontrar cambios en los residuos respecto a la secuencia consenso. El motivo del subdominio I (GxGxxG) es el también llamado “lazo G”, ya que está compuesto por tres glicinas que forman una especie de bolsillo en el que se une el ATP gracias a la flexibilidad aportada por las cortas cadenas de los residuos de glicina (-H). ADCK2 tiene un cambio en la tercera glicina por una alanina, y es un cambio conservativo que encontramos en el resto de miembros de la familia ABC1. En principio este cambio podría afectar a la unión del ATP, pero hay que tener en cuenta que la alanina es el aminoácido más parecido de todos a la glicina, con una cadena también corta (-CH₃), y que por tanto podría suplir la función de la glicina. El motivo del subdominio II (VAIK) es también esencial, especialmente la lisina que interactúa con los fosfatos α y β del ATP, anclándolo y orientándolo de forma correcta. ADCK2 cambia el residuo de isoleucina por valina, un cambio que podría afectar a la funcionalidad, pero que no acarrea un cambio en la

carga del residuo. Sin embargo hay unas pocas quinasas que han retenido su función incluso después de la pérdida de residuos esenciales, como la familia WNK (*with no K*) que han perdido la esencial lisina del motivo VAIK y aun así mantienen su capacidad para fosforilar, ya que está estructuralmente compensado por un residuo de lisina presente en el dominio I (Zeqiraj & Van Aalten, 2010), por lo que la pérdida de la isoleucina en ADCK2 podría no ser tan grave para la funcionalidad como se podría pensar a priori. En el motivo del subdominio VI-B (HRDLxxN) el residuo clave es el aspártico que logra la transferencia de protones. Este residuo está presente en ADCK2, no así la arginina previa que se cambia por una alanina, un cambio importante, ya que la alanina no tiene carga y la arginina tiene carga positiva, además de una cadena mucho más larga. En el motivo del subdominio VII (DFG) el residuo esencial es el aspártico, que une los iones Mg^{2+} que coordinan los fosfatos α y β del ATP en la hendidura de unión del ATP. Este motivo no se encuentra en ADCK2 y puede afectar por tanto a su presunta función quinasa.

Como hemos visto, ADCK2 carece de varios motivos presentes en otras quinasas, especialmente hay que destacar el motivo DFG, y tiene otros motivos en los que hay cambios en los residuos respecto de la secuencia consenso. No podemos afirmar que estos cambios y ausencias sean suficientes para anular la supuesta actividad quinasa de ADCK2 y que por tanto estemos hablando de que se trate de una pseudoquinasa, pero el hecho de la singularidad de la familia ABC1, los cambios en los motivos quinasa y el no haber detectado actividad quinasa; nos hace pensar que ADCK2 realmente se trata de una pseudoquinasa.

A

Subdominio quinasa	I	II	III	VI-B	VII
Secuencia consenso	G _x G _{xx} G	VAIK	E	HRDL _{xxx} N	DFG
Secuencia ADCK2	207G S Gc vA 212	308 VAV K311	348 E 348	442 HAD LHPG N 449	---

B

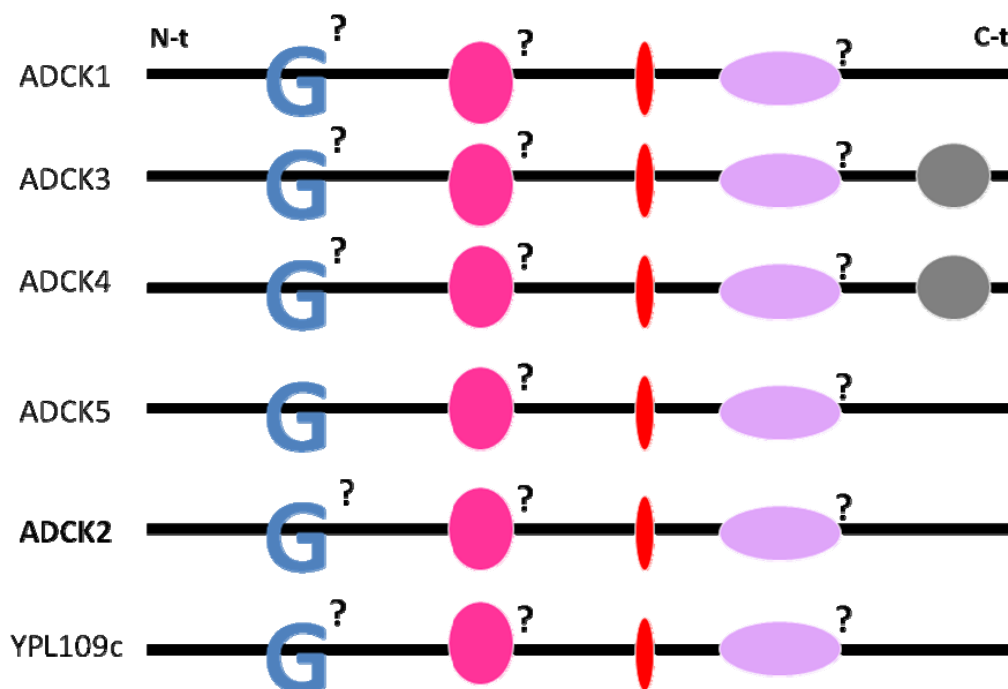


Figura 43. Estudio de la secuencia de los dominios (pseudo)quinasa en la familia ABC1 y la proteína YPL109c. En **A)** se observan las secuencias consenso de cinco de los doce dominios quinasa más conservados en proteínas quinasa y el dominio encontrado en la proteína ADCK2. En rojo se marcan los aminoácidos conservados en el dominio que son sustituidos por otros en la secuencia de ADCK2. Al principio y al final de la secuencia del dominio en ADCK2 se señala la posición numérica de los aminoácidos. En **B)** se representan los cinco miembros de la familia ABC1 además de la proteína de *Saccharomyces cerevisiae* YPL109c. Se representan los mismos cinco dominios representados en A, en los que se incluye el signo de interrogación si no encontramos al menos uno de los aminoácidos conservados.

En un intento de probar si ADCK2 podría actuar como una pseudoquinasa modificando la actividad de otras quinasa, de manera análoga a como lo hace la pseudoquinasa STRAD, realizamos un ensayo de fosforilación con quinasa comerciales en presencia de distintas cantidades de ADCK2-GST y vimos si se modificaron los patrones de fosforilación (Figura 44)

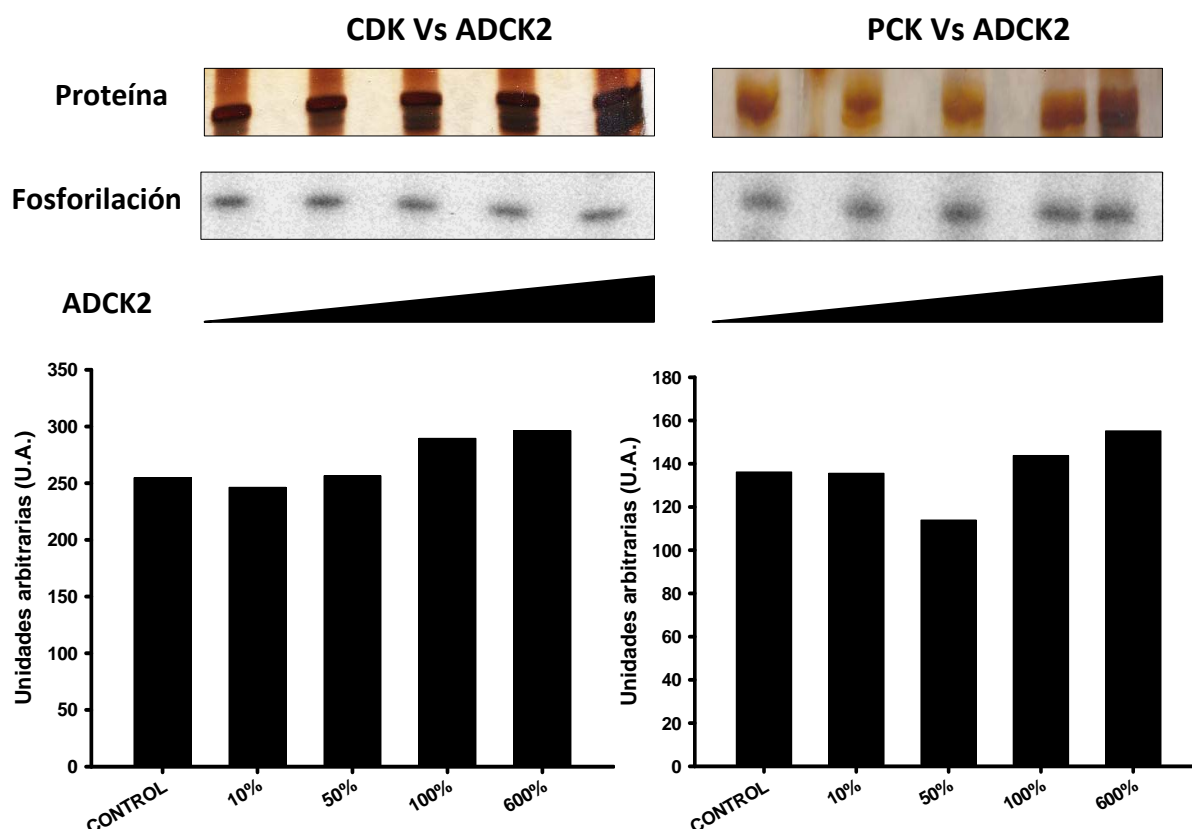


Figura 44. Ensayo quinasa de PKC y CDK en presencia de distintas cantidades de ADCK2-GST.

Se cuantificó la cantidad de proteína y nivel de fosforilación de la banda de histonas correspondiente a 30kDa. El ensayo se realizó en concentraciones crecientes de ADCK2-GST desde un 10% de la cantidad de quinasa comercial hasta un 600%, no añadiéndose en el ensayo control. En las gráficas se representa el nivel de fosforilación de la banda de histonas respecto a su carga de proteína.

Tras aumentar hasta en 6 veces la presencia de ADCK2-GST respecto a la quinasa CDK o PKC en el ensayo, no observamos cambios significativos en los niveles de fosforilación de las histonas. No podemos afirmar, por tanto, que ADCK2 sea una pseudoquinasa que modifique la actividad de CDK o PKC. Si como hemos comentado en este apartado ADCK2 es probablemente una pseudoquinasa, actuará sobre un sustrato específico como lo hace la pseudoquinasa STRAD sobre LKB1 y por tanto el ensayo se deberá realizar con dicho elemento y no con una quinasa comercial.

Con todos los datos obtenidos respecto de la función catalítica de ADCK2, podemos concluir que ADCK2 es una proteína perteneciente a una familia de quinasas atípicas en la que no se ha podido detectar actividad quinasa, muy probablemente por la carencia de varios motivos del dominio quinasa como el del esencial subdominio quinasa VII. La probable, aunque no totalmente descartable, inactivación de la función

quinasa de ADCK2 nos llevaría a denominarla como una pseudoquinasa que podría actuar sobre un elemento concreto, probablemente perteneciente a la ruta de biosíntesis del coenzima Q.

4. Aproximación terapéutica de la deficiencia de CoQ₁₀ mediante la transducción con partículas lentivíricas

Una vez que intentamos caracterizar molecularmente *ADCK2* y tras determinar que la causa de la deficiencia de CoQ₁₀ observada en los pacientes era la mutación del gen *ADCK2*, quisimos intentar suplir dicha deficiencia en los propios fibroblastos de los pacientes. Para esto se procedió a la expresión de forma estable y permanente del gen *ADCK2*, por lo que se utilizó la técnica de transducción con partículas lentivíricas como se explica en el punto 4.3.3. de Materiales y Métodos. Como modelo para poder aplicar la técnica posteriormente al resto de fibroblastos de pacientes con deficiencia de CoQ₁₀, se utilizaron los fibroblastos que presentaban un mayor déficit de CoQ₁₀, los del paciente ADCK2-P3.

Para la expresión permanente de *ADCK2* se realizó el clonaje del gen en el vector pRRL que porta el marcador GFP, como se explica en el punto 5.3 de Materiales y Métodos. La expresión de *ADCK2* estaría controlada por el promotor EF-1 α y la de la GFP por el promotor PGK. Posteriormente se procedió al empaquetamiento de las partículas lentivíricas con el plásmido (punto 4.3.3.1. de Materiales y Métodos) y finalmente a la infección de las partículas lentivíricas en los fibroblastos ADCK2-P3 (punto 4.3.3.2. de Materiales y Métodos). Tras la transducción, una o dos copias, por norma general, del vector se insertan en el genoma del fibroblasto y tras 48 horas se comienza a detectar la expresión de proteína.

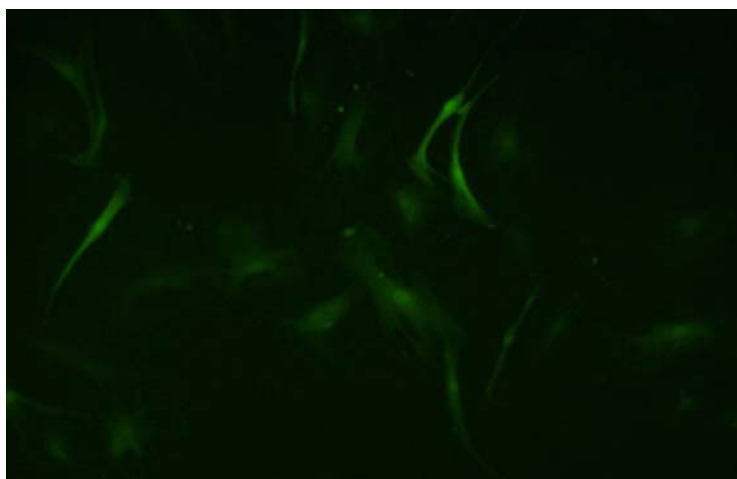


Figura 45. Fibroblastos ADCK2-P3 expresando GFP. Imagen al microscopio de fluorescencia de fibroblastos ADCK2-P3 tras 48 horas de la transducción con partículas lentivíricas que portaban la construcción pRRL-ADCK2-GFP. Aumento 10X.

Como control de que la transducción se ha realizado de forma exitosa, se puede detectar al microscopio de fluorescencia la presencia de proteína GFP, como se observa en la figura 45. Como el porcentaje de fibroblastos transducidos no es del 100 %, las células se sometieron a una purificación de la población GFP positiva mediante su detección por “cell sorter”. Una vez que se consiguió una población de fibroblastos ADCK2-P3 100 % positiva para GFP y, por tanto, para ADCK2, se procedió a determinar el nivel de ARNm y de proteína de ADCK2, como se observa en la figura 46.

A

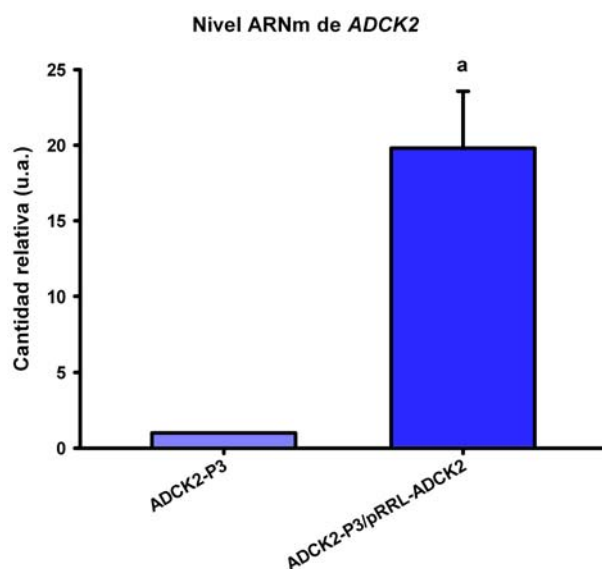
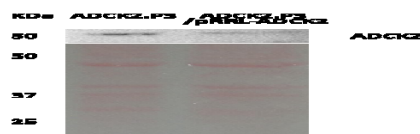


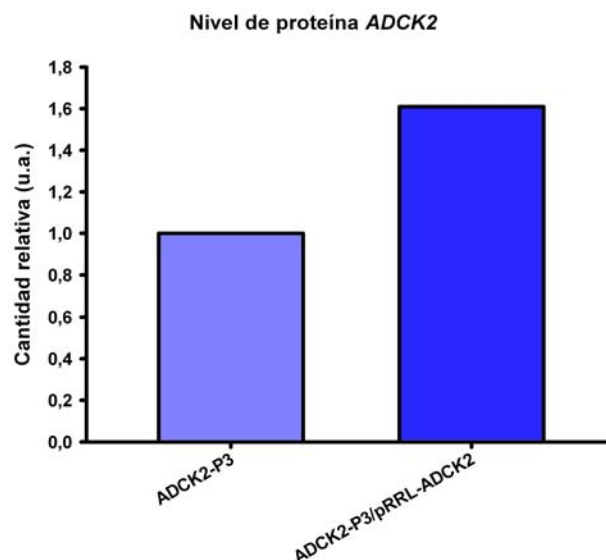
Figura 46. Determinación de la expresión de ADCK2 en ADCK2-P3/pRRL-ADCK2. A)

Cantidad de ARNm de ADCK2 detectado por PCR a tiempo real. $a=P<0.05$ **B)** En la parte superior Inmunotinción con anti-ADCK2 a partir de 15 µg de una extracción de proteínas de un extracto total de células, en la parte inferior tinción con Ponceau-S de la misma membrana de nitrocelulosa, utilizada como control de carga. Experimento representativo de una serie de ellos. **C)** Representación de la cantidad de proteína ADCK2 cuantificada en A) con el programa ImageJ y normalizada con la tinción con Ponceau-S.

B



C



Se observó que en los fibroblastos GFP⁺ la expresión de ADCK2 era 19.81 veces mayor que en los fibroblastos sin transducir. Este aumento en la cantidad de ARNm se reflejaba en un aumento también de la cantidad de proteína ADCK2, aunque de mucha menor proporción, ya que el aumento en la cantidad de proteína fue de un 61 %.

Una vez observado el aumento en la cantidad de proteína ADCK2 en los fibroblastos transducidos con la construcción pRRL-ADCK2, se procedió a la medida de la cantidad de CoQ₁₀. Para esto, además de utilizarse un control de células sanas, se utilizó un segundo control de fibroblastos ADCK2-P3 transducidos con el plásmido pRRL vacío, es decir, que sólo expresan GFP (Figura 47).

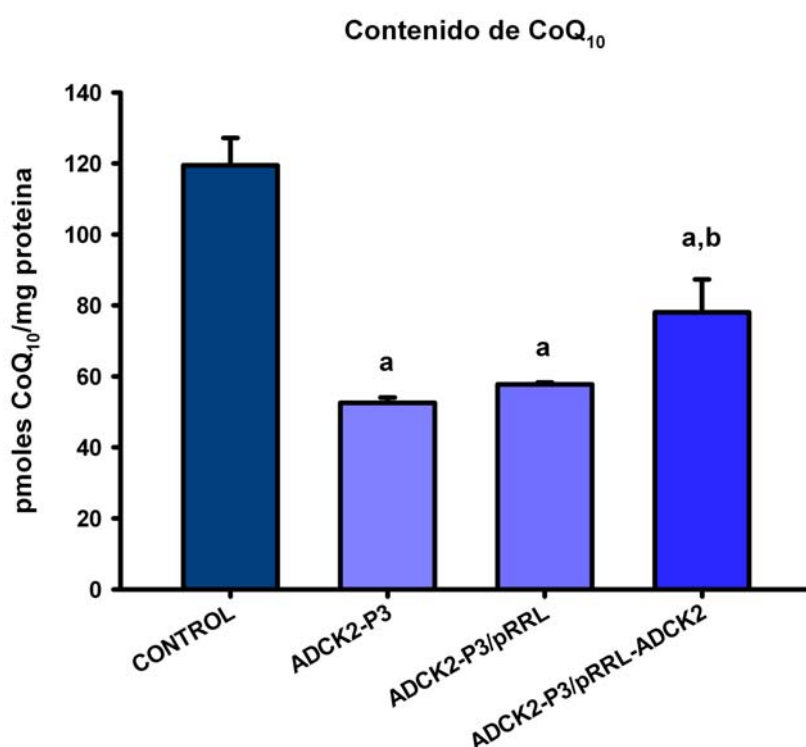


Figura 47. Determinación de CoQ₁₀ en fibroblastos ADCK2-P3 tras la transducción con partículas lentivíricas. La cantidad de CoQ₁₀ se determinó a partir de un homogenado de células tras un mínimo de 10 días de cultivo tras la transducción. Tras extraer los compuestos lipídicos, éstos se separaron mediante HPLC-ECD. Diferencias respecto al control a=P<0.05 Diferencias respecto a ADCK2-P3 b=P<0,05.

Tras la medida del nivel de CoQ₁₀, se observó que el nivel encontrado en ADCK2-P3/pRRL fue similar al de ADCK2-P3, por lo que el proceso de transducción, inserción del vector en el genoma y expresión de la proteína GFP prácticamente no tenía efectos sobre la cantidad total de CoQ₁₀. Sin embargo los fibroblastos ADCK2-P3 que

expresaban la versión silvestre de ADCK2 (ADCK2-P3/pRRL-ADCK2) mostraron un aumento en los niveles de CoQ₁₀ respecto a los fibroblastos ADCK2-P3. En concreto se observó una recuperación del 38.1 % de CoQ₁₀ respecto del nivel observado en los fibroblastos control.

Hay que tener presente que en los fibroblastos ADCK2-P3/pRRL-ADCK2 coexisten el ADCK2 silvestre con la versión mutada de ADCK2, por lo que puede existir un efecto competición por parte de la versión mutada de ADCK2 que puede explicar la no recuperación total del nivel de CoQ₁₀ observado en los fibroblastos control. Aún así, la recuperación parcial de CoQ₁₀ observada en ADCK2-P3/pRRL-ADCK2 nos indica nuevamente que ADCK2 es el responsable de ese déficit y que su expresión puede ser usada de forma terapéutica para el tratar la deficiencia de CoQ₁₀.

5. Discusión final

En el punto 1 del presente apartado caracterizamos fenotípicamente los fibroblastos provenientes de pacientes con mutaciones en *ADCK2* utilizando como control, además de fibroblastos de una persona sana, fibroblastos de un paciente con deficiencia secundaria de CoQ₁₀ por mutaciones en *ETFDH*. Hemos podido observar que los fibroblastos con mutaciones en *ADCK2* tienen una deficiencia de CoQ₁₀, aunque una tasa de síntesis aumentada, una actividad disminuida en los complejos I y II de la cadena respiratoria, una β -oxidación defectuosa y en algunos casos una acumulación de lactato en el medio. Todos estos parámetros detectados como anormales indicaban un mal funcionamiento del metabolismo mitocondrial, algo que se podía relacionar en *ADCK2*-P2 y P3 con la menor masa mitocondrial detectada.

Con esos resultados podíamos relacionar las mutaciones en *ADCK2* con un defecto mitocondrial e intuir, por los datos “*in silico*” anteriores, que el origen de ese defecto general era debido al defecto encontrado en el nivel de CoQ₁₀. Dicho defecto afectaría indirectamente al resto de procesos, aunque no podíamos descartar aún que fuese otro proceso el que estuviera afectado directamente y el déficit de CoQ₁₀ de forma indirecta.

Por tanto, para determinar que realmente *ADCK2* intervenía directamente en la síntesis de CoQ₁₀, realizamos en el punto 2 la complementación funcional en *Saccharomyces cerevisiae* y los estudios de silenciamiento y sobreexpresión transitoria de *ADCK2* en MRC5. Determinamos que la estirpe nula en el gen ortólogo de levaduras *YPL109c* tenía un déficit de CoQ₆ y también un defecto en el complejo I de la cadena respiratoria, pero no así en la β -oxidación de los ácidos grasos, ya que este proceso se produce fuera de la mitocondria y es ajeno a la participación del CoQ₆. Este hecho unido al dato de que fibroblastos con mutaciones en enzimas que intervienen en la degradación de los ácidos grasos no tienen un déficit de CoQ₁₀ nos hizo descartar que *ADCK2* participara directamente en la β -oxidación.

Por otra parte, tras complementar con el gen humano *ADCK2* (y también con *YPL109c*) podemos recuperar en la estirpe nula de *YPL109c* el nivel de CoQ₆ presente en la estirpe silvestre, pero no la actividad del complejo I. Esto nos indica que *ADCK2*

interviene directamente en la síntesis de CoQ₁₀, que es el proceso que claramente se recupera, pero pensamos que debe existir un defecto adicional en dichas estirpes que impide que la actividad de la cadena respiratoria se recupere de forma clara. Podríamos especular con que ADCK2 podría intervenir también como proteína estabilizadora o de unión entre supercomplejos de la cadena respiratoria y complejo de síntesis de coenzima Q y que su sobreexpresión podría tener efectos negativos sobre éstos. Una nueva prueba de que ADCK2 interviene directamente en la síntesis del CoQ₁₀ fue el hecho de que al silenciar transitoriamente el gen en células MRC5, la tasa de síntesis disminuía en un 50 %. Por último, en el punto 4, se realizó el rescate del fenotipo en los fibroblastos ADCK2-P3. Aunque dicho rescate fue parcial por las circunstancias ya comentadas en dicho punto, este dato se suma al de la complementación de ADCK2 en levaduras, apoyando la relación directa entre ADCK2 y síntesis de CoQ₁₀.

Tras concluir que ADCK2 interviene directamente en la ruta de síntesis del CoQ₁₀, determinamos que no podía hacerlo formando parte de uno de los pasos catalíticos de la ruta de síntesis, es decir, debería intervenir como un elemento regulador, ya que ADCK2 no es un elemento imprescindible para que se produzca la síntesis de CoQ₁₀. Esto lo observamos en la estirpe nula en el gen *YPL109c*, que a pesar de carecer del gen, es capaz de sintetizar un 60 % del CoQ₆ de la estirpe silvestre y de crecer y tener un metabolismo respiratorio, aunque deficiente, en un medio con una fuente de carbono no fermentable como el glicerol. Por otro lado, en los fibroblastos de los pacientes detectamos una tasa de síntesis de CoQ₁₀ en condiciones óptimas muy elevada, lo que sugería que la maquinaria de síntesis del CoQ₁₀, en lo que respecta a sus pasos catalíticos sería funcional. Ambos hechos, que la estirpe nula sintetice CoQ₆ y que la tasa de síntesis en los fibroblastos con mutaciones en ADCK2 esté aumentada, son opuestos a lo observado en los casos de genes considerados que forman parte del complejo de síntesis como COQ2 o COQ4. En ambos casos, la respectiva estirpe nula de levadura carece de CoQ₆ y es incapaz de crecer en medios no fermentables, y fibroblastos de pacientes con mutaciones tienen una tasa de síntesis disminuida, ya que el complejo de síntesis se encuentra afectado, algo que no ocurre en el caso de ADCK2.

En el punto 3 intentamos realizar una caracterización molecular de *ADCK2*. Analizamos el perfil de expresión del gen en *Mus musculus* llegando a la conclusión de que su expresión era mayor en los órganos que más dependían del metabolismo aeróbico y que presentaban una mayor cantidad de coenzima Q. También que su expresión en el desarrollo embrionario aumentaba durante la organogénesis y en el momento en que se produce un cambio del metabolismo anaeróbico al aeróbico, con la maduración de la membrana interna mitocondrial.

La proteína *ADCK2* fue localizada a nivel mitocondrial, concretamente en la matriz o anclada a la cara interna de la membrana interna mitocondrial, sin poder descartarse que también pueda encontrarse en MAMs. En cuanto a su función, pudimos descartar que su probable actividad quinasa, así como una posible función pseudoquinasa, se lleve a cabo sobre sustratos genéricos o quinasas conocidas. Además de por no haber sido detectada, la supuesta actividad quinasa ha quedado en entredicho, ya que tras el estudio de los dominios quinasa presentes en *ADCK2* se han observado cambios importantes respecto a la secuencia consenso. Aún así no podemos descartar por completo que *ADCK2* tenga una actividad quinasa sobre un sustrato desconocido.

Tras concluir que mutaciones en *ADCK2* llevan asociado un déficit de CoQ₁₀ que acarrea un defectuoso funcionamiento de la mitocondria, y que *ADCK2* interviene directamente en la síntesis de CoQ₁₀ y que lo hace no participando en uno de los pasos catalíticos de la ruta de síntesis; las deficiencias de CoQ₁₀ detectadas en los pacientes no pueden ser consideradas como deficiencias primarias ni como secundarias. Aunque fenotípicamente los fibroblastos con mutaciones en *ADCK2* se comportan de forma muy parecida a ETFDH-P1, al participar *ADCK2* en la síntesis de CoQ₁₀ tenemos que descartar el término “deficiencia secundaria”, ya que todos los casos conocidos de mutaciones en genes que provoquen una deficiencia secundaria, lo son en genes que no intervienen en la síntesis de CoQ₁₀. Por otra parte, la deficiencia primaria de CoQ₁₀ ocurre cuando se ve afectado un elemento de la ruta de síntesis del CoQ₁₀, por lo que en principio éste sería en caso de *ADCK2*. Sin embargo, todos los casos conocidos de deficiencia primaria son debidos a mutaciones en los genes que *COQ*, es decir, en los genes que forman parte del complejo de síntesis y la ruta catalítica y cuya carencia en

Este diagrama ilustra la cadena de transporte de electrones (CTE) en la membrana mitocondrial interna, mostrando el flujo de electrones (e^-) a través de varios complejos y la generación de un gradiente de protones.

Componentes y Flujo de Electrones:

- Matriz:** El espacio interior de la mitocondria, donde ocurren el ciclo de Krebs y el β -oxidación.
- Membrana Interna:** La membrana que separa la matriz del espacio intermembrana.
- Complejos de la CTE:**
 - C.I (Complejo I):** Recibe electrones directamente de la matriz y los transfiere a ADCK2.
 - ADCK2:** Transfiere electrones al Complejo II.
 - C.II (Complejo II):** Transfiere electrones al Complejo III.
 - Complejo Síntesis:** Un complejo que participa en la síntesis de pirimidinas, ubicado en la membrana interna.
 - Q₁₀:** Un transportador de electrones que recibe electrones del Complejo II y los transfiere al Complejo III.
 - DHODH:** Un transportador de electrones que recibe electrones del Complejo II y los transfiere al Complejo III.
 - C.III (Complejo III):** Recibe electrones de Q₁₀ y DHODH, y los transfiere a CitC.
 - CitC:** Un transportador de electrones que recibe electrones de C.III y los transfiere al Complejo IV.
 - C.IV (Complejo IV):** Recibe electrones de CitC y los transfiere al Complejo V.
 - C.V (Complejo V):** El último receptor de electrones en la cadena.
- Proteínas y Procesos Asociados:**
 - CICLO DE KREBS:** El ciclo central del metabolismo energético que genera electrones para la CTE.
 - β -OXIDACIÓN:** El proceso de degradación de ácidos grasos que genera electrones para la CTE.
 - ETF (Enzima Transportadora de Electrones):** Recibe electrones de β -oxidación y los transfiere a ETFQ.
 - ETFQ (Enzima Transportadora de Electrones Quinona):** Recibe electrones de ETF y los transfiere al Complejo III.
- Membrana Externa:** La membrana que rodea la mitocondria, que actúa como una barrera para los protones.

Para finalizar en la figura 48 proponemos un modelo ciertamente especulativo del papel de *ADCK2* en la síntesis de CoQ₁₀ y su implicación en el metabolismo mitocondrial. Mutaciones o defectos en *ADCK2* afectarían directamente a la ruta de síntesis del CoQ₁₀, acarreado una deficiencia de ésta y afectando a diversos procesos en la mitocondria debido a la deficiencia de CoQ₁₀. El déficit de CoQ₁₀ afectaría a todos

los procesos que ceden electrones a la molécula de CoQ₁₀, ralentizándolos y disminuyendo su actividad. Dichos procesos serían la β -oxidación de los ácidos grasos, el complejo I y II de la cadena respiratoria y un cuarto elemento que sería la ruta de síntesis de las pirimidinas. Aunque no hemos analizado el estado de la ruta de síntesis de las pirimidinas en el presente trabajo, es muy probable que también se encuentre afectada, ya que para su correcto funcionamiento la proteína dihidroorotato deshidrogenasa debe ceder electrones al CoQ₁₀ para generar orotato y a partir de él las pirimidinas.

Un quinto elemento que tampoco hemos analizado, pero que también es probable que se encuentre afectado, es el ciclo de Krebs. Primero porque también cede electrones al CoQ₁₀, aunque de forma indirecta a través del complejo I de la cadena respiratoria y segundo porque el propio complejo II de la cadena respiratoria, que se encuentra afectado, es un elemento del ciclo de Krebs.

El hecho de que en levaduras tras sobreexpresar *YPL109c* o *ADCK2* se recupere el nivel de CoQ₆ pero no la actividad del complejo I, nos hace pensar que *ADCK2* pudiera tener una función adicional además de en la síntesis de CoQ₁₀. De forma especulativa podríamos explicar este hecho con que *ADCK2* pudiese jugar un papel regulatorio en la síntesis de CoQ₁₀ pero afectando también a la estabilidad de los supercomplejos respiratorio y con la sobreexpresión recuperar el nivel de CoQ₁₀ pero no poder estabilizar los supercomplejos de la cadena respiratoria, al poder afectar negativamente la sobreexpresión. Incluso podríamos ir más lejos y de forma muy especulativa plantear que *ADCK2* pudiera ser un elemento intermedio que estabilizara tanto los supercomplejos respiratorios como al complejo de síntesis.

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

Conclusiones

1. Las mutaciones en el gen *ADCK2* encontradas en los pacientes se asocian a una deficiencia de coenzima Q que puede acarrear un cuadro clínico de gravedad.
2. En los fibroblastos de los pacientes se observa una disfunción mitocondrial que se puede justificar mediante la deficiencia de coenzima Q asociada a las mutaciones de *ADCK2*, ya que estos fibroblastos mostraron:
 - a. Una menor actividad de los complejos I y II.
 - b. Un defecto en la β -oxidación de los ácidos grasos.
 - c. En algunos casos una acumulación de lactato en el medio de cultivo.
3. La proteína *ADCK2* está implicada en la síntesis de coenzima Q, ya que:
 - a. El silenciamiento transitorio disminuye la tasa de síntesis de coenzima Q.
 - b. La estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* mutante nulo en el gen ortólogo *YPL109c* muestra un déficit de coenzima Q.
 - c. Al sobreexpresar *ADCK2* en el mutante nulo en *YPL109c* se recupera el nivel de coenzima Q de la estirpe silvestre.
 - d. Al sobreexpresar *ADCK2* mediante la transducción de los fibroblastos *ADCK2*-P3 con partículas lentivíricas se recupera parcialmente el nivel de coenzima Q.
4. La proteína *ADCK2* no tiene una función catalítica en la síntesis de coenzima Q, ya que:
 - a. La estirpe mutante nula en *YPL109c* es capaz de producir coenzima Q y crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables.
 - b. Los fibroblastos de los pacientes muestran una elevada tasa de síntesis de coenzima Q.
5. Al ser *ADCK2* un elemento regulatorio de la ruta de síntesis del coenzima Q, la deficiencia generada por mutaciones en el gen no pueden ser consideradas como primarias o secundarias, proponiéndose el término deficiencia primaria indirecta de coenzima Q.
6. La proteína *ADCK2* se encuentra localizada en la matriz o anclada a la cara interna de la membrana interna mitocondrial.
7. La proteína *ADCK2* no muestra actividad quinasa sobre sustratos universales de quinasas ni función pseudoquinasa sobre quinasas conocidas.

Conclusions

1. Mutations in the ADCK2 gene found in the patients are associated with a deficiency of coenzyme Q. This mutations can generate a severe clinical syndrome.
2. In patients fibroblasts we can observe a mitochondrial dysfunction which can be explained by the deficiency of coenzyme Q associated with the mutations in ADCK2 gene. The fibroblasts showed:
 - a. A decreased activity in both, complex I and II.
 - b. A default in the β - oxidation of fatty acids.
 - c. In some cases there is an accumulation of lactate in the culture medium.
3. The ADCK2 protein is involved in the synthesis of coenzyme Q, since:
 - a. The short-term silencing of ADCK2 decreased the synthesis rate of coenzyme Q.
 - b. The strain knock out for the orthologous gene YPL109c of *Saccharomyces cerevisiae* shows a coenzyme Q deficit.
 - c. The overexpression of ADCK2 in the knock out YPL109c strain recovers the levels of coenzyme Q showed in the wild type strain.
 - d. The overexpression of ADCK2 by lentiviral particles transduction in the ADCK2-P3 fibroblasts is able to recover partially the coenzyme Q level.
4. The ADCK2 protein does not show a catalytic function in the coenzyme Q synthesis rate since:
 - a. The knock out strain in YPL109c is able to synthesize coenzyme Q and the strain can growth on non-fermentable carbon sources media.
 - b. Patients fibroblasts show a high coenzyme Q synthesis rate.
5. As a regulatory element of coenzyme Q synthesis pathway, the deficiency generated by mutations in ADCK2 gene can be considered to be neither primary nor secondary. We propose the term primary indirect deficiency of coenzyme Q.
6. The ADCK2 protein is located in the mitochondrial matrix or anchored to the internal face of the mitochondrial inner membrane.
7. The ADCK2 protein does not show kinase activity over universal substrata for kinase proteins. Neither the protein shows a pseudokinase function over well-known kinases.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Métodos generales de bacterias

1.1. Estirpes, medios y cultivo

Se usó la estirpe *Escherichia coli* DH5 α (F-, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1) para la transformación y almacenaje de las construcciones generadas en los distintos plásmidos. La estirpe de *E. coli* BL21 (B F- dcm ompT hsdS(rB-mB) gal) se utilizó para la purificación de la proteína recombinante ADCK2.

El cultivo de las distintas estirpes se realizó de forma rutinaria en medio Luria Broth (LB), 1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura y 1 % NaCl (Pronadisa) en agitación (220 rpm) a 37°C. Para la selección de estirpes con antibióticos se usó ampicilina (10 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml).

1.2. Medida del crecimiento en cultivo

Se determinó la D.O. en el espectrofotómetro CARY50Bio a una longitud de onda de 600nm.

1.3. Transformación con ADN plasmídico

Para la transformación de bacterias se usaron *E. coli* DH5 α competentes mediante el tratamiento con CaCl₂. Para esto se sembró un cultivo de 50 ml a una Abs_{600nm}=0.25 y se esperó a que alcanzara una Abs_{600nm}=0.5. Las bacterias se centrifugaron en frío y se resuspendieron, en frío, en una solución estéril de CaCl₂ 50 mM durante 2 horas. Las bacterias (50 μ l) se descongelaron en hielo y se dejaron incubando 30 minutos con 30-100 ng del vector a transformar. Tras esto se procedió a dar un choque térmico a 42°C durante 2 minutos en un baño con agitación. Tras dejar reposar en hielo 5 minutos, las bacterias se incubaron con 1 ml de LB a 37°C durante 30 minutos (para seleccionar con ampicilina) o 60 minutos (para seleccionar con tetraciclina). Finalmente, tras centrifugar y resuspender en 500 μ l de LB, se sembraron en dos placas selectivas 50 μ l y 450 μ l respectivamente y se dejaron a 37°C hasta el día siguiente.

2. Métodos generales de levaduras

2.1. Estirpes, medios y cultivo

Las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron de EUROSCARF (European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis). En la siguiente tabla se resumen las estirpes utilizadas:

Tabla 2

Estirpe	Genotipo
BY4741	MAT a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0
Δ YPL109c	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL109c::kanMX4

En general los medios de cultivo y manipulación de las estirpes utilizadas en este proyecto se basaron en los manuales básicos de laboratorio (Campbell & Duffus, 1988; Guthrie & Fink, 1991).

- **Medios ricos:** Las levaduras se cultivaron de forma rutinaria en medios con 2 % de peptonas y 1 % de extracto de levaduras, al que se le añadió como fuente de carbono azúcares fermentables, glucosa al 2 % (*medio YPD*), o fuente de carbono no fermentable, glicerol al 2 % (*medio YPG*).
- **Medios selectivos:** Para el cultivo y mantenimiento de las estirpes transformadas se usó un medio sin uracilo (*medio SD-ura*) con 1,75 g/L de YNB, 3,5/L g de sulfato amónico, 1 g/L de fosfato potásico monobásico, 2 % de glucosa como fuente de carbono fermentable y 1,73 g/L de una mezcla de aminoácidos esenciales y nucleótidos excluyendo el uracilo con un pH=6.
- **Otros medios:** Para el cultivo de las distintas estirpes generadas también se usó un medio con 0.5 % ácido acético (*medio YPAc*) como fuente de carbono no fermentable (1,75 g/L de YNB, 3,5/L g de sulfato amónico, 1 g/L de fosfato potásico monobásico, extracto de levadura 5 g/L y 1,73 g/L de una mezcla de aminoácidos esenciales y nucleótidos excluyendo el uracilo con un pH=5.5).

Para los cultivos en medio sólido se añadió 2 % de agar al medio líquido. Todos los cultivos tanto en medio líquido como en sólido se incubaron a 30°C.

2.2. Medida del crecimiento en cultivo

Se determinó la D.O. en el espectrofotómetro CARY50Bio a una longitud de onda de 660 nm. Una unidad de D.O. en fase exponencial equivale a 26 millones de células/ml, 2,6 mg de peso fresco ó 0,8 mg de peso seco. Si nos encontramos en fase estacionaria, equivale a 18 millones de células/ml, 1,8 mg de peso fresco, ó 0,45 mg de peso seco (Serrano, 1988).

2.3. Transformación con ADN plasmídico

Para la transformación con ADN plasmídico en levaduras se utilizó el método del acetato de litio (Agatep & Kirkpatrick, 1999).

A partir de un cultivo de levaduras crecidas hasta una $D.O_{660nm}=0,8$ unidades, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de acetato de litio 0,1M durante 5 minutos. A partir de 50 µl de la suspensión se añadieron, en el siguiente orden, estos componentes:

- 240 µl PEG 50%
- 36 µl acetato de litio 1M
- 10 µl ADNss 10 mg/ml (Salmon Testes DNA, Sigma)
- 5 µl plásmido
- 35 µl H₂Odd.

Se vorteoó 30 segundos y se incubó 30 minutos a 30°C y otros 30 minutos a 42°C. Finalmente, tras se centrifugar y lavar con agua estéril, se resuspendió en 500 µl de agua estéril y se sembró 50 µl en placas selectivas, apareciendo las primeras colonias con transformantes después de incubar a 30°C durante 48 horas.

2.4. Ensayo de crecimiento de cultivos en *Sacharomyces cerevisiae*

Para la medida del crecimiento de las distintas estirpes de levaduras generadas se preparó un cultivo a una $D.O_{660nm}=0,2$ a partir de un preinóculo saturado. Los cultivos fueron de 5 ml y las medidas de crecimiento se realizaron hasta la llegada de la fase estacionaria.

2.5. Ensayo de viabilidad en placas en *Sacharomyces cerevisiae*

Para observar la viabilidad en placa de las distintas estirpes se prepararon los cultivos a una $D.O_{660nm}=2$ a partir de un preinóculo saturado. A partir de esa concentración se realizaron 6 diluciones sucesivas de 1/10 veces y se sembraron 3 μ l de cada dilución en la placa formando una matriz de spots. Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C.

3. Métodos generales de ratones

3.1. Cepa, y condiciones de mantenimiento

Los ratones fueron alojados en jaulas de policarbonato autoclavables respetando los requerimientos de espacio mínimo por animal según el Consejo de Europa, Convención ETS 123, Anexo A, 2000 (Council of Europe, 2006). Las condiciones ambientales de estabulación fueron de un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. La hora de comienzo del periodo de luz fue a las 8:00. La temperatura y humedad oscilaron dentro del rango $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y de $54 \pm 1\%$ respectivamente. En las jaulas se colocó serrín y además se enriqueció con juguetes de policarbonato y recortes de cartón o papel. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar de laboratorio para ratón, ref. 2014S Teklad Global 14 % Protein Rodent Diet - Harlan, Italia (Composición: proteínas 14.30 %, lípidos 4 %, fibras 4.1 %, agua 12 %, vitaminas y minerales). Toda la manipulación con los animales fue aprobada por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad Pablo de Olavide.

Tabla 3

Cepa	Procedencia
C57BL/6J	Laboratorios Charles River, España

4. Métodos generales de cultivos celulares

4.1. Tipos celulares, medios y cultivo

Se usaron tanto cultivos primarios de fibroblastos provenientes de pacientes, como diversas líneas celulares. Las condiciones de cultivo de todas las células fueron en un incubador a 37°C con 5 % CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas aproximadamente. Para pasar las células se lavó primero con PBS1X y se levantaron con tripsina-EDTA 0.25 % (Sigma) tras incubarlas 5 minutos en el incubador a 37°C. Todos los medios utilizados se calentaron a 37°C para no causar estrés térmico a las células. De forma rutinaria las células se centrifugaron a una velocidad de 700xg.

En la siguiente tabla se encuentran los cultivos primarios de fibroblastos usados. Proviene de biopsias de piel de diversos pacientes proporcionados por otros laboratorios colaboradores o de la casa comercial Tebu-Bio que nos suministró los fibroblastos que fueron usados como control.

Tabla 4

Nombre	Mutación/es	Medio cultivo	Procedencia
Control HDF (Human dermal fibroblasts)	---	DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Tebu-Bio (Comercial)
ETFDH-P1	g.1367C>T, p.456P>L Heterocigosis g.1768A>G, p.590K>E Heterocigosis	DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Dra. Rita Horvath (Alemania)
ADCK2-P1	g.1522C>T, p.333R>Stop Heterocigosis	DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Dra. Sandra Jackson, (Alemania)
ADCK2-P2	g.1522C>T, p.333R>Stop Heterocigosis	DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Dra. Sandra Jackson, (Alemania)
ADCK2-P3	g.1817C>T, p.606P>L Homocigosis	DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Dra. Orly Elpeleg (Israel)
CPTII-P1	g.338 C>T, p.113S>L Heterocigosis g.1492 C>T, p.498R>C Heterocigosis	DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Dra. Sandra Jackson, (Alemania)
VLCAD-P1		DMEM 1g/LGlucosa 20% SFB	Dra. Sandra Jackson, (Alemania)

Todos los fibroblastos fueron cultivados en medio DMEM (Gibco) 1 g/L de glucosa suplementado con 1 % solución antibiótica/antimicótico (Sigma) y 20 % de suero fetal bovino (SFB).

En el caso de las líneas celulares utilizadas, los medios variaron según la línea. Para la transfección de las células con siRNA o ADNplasmídico se usó el medio Opti-MEM (Gibco).

Las características de las líneas celulares utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5

Línea celular	Medio cultivo	Procedencia
MRC5	DMEM 1g/LGlucosa 10% SFB	American Type Culture Collection
HEK293	DMEM 4,5g/LGlucosa 10% SFB	DSMZ

4.2. Medida del crecimiento del cultivo y de la viabilidad celular

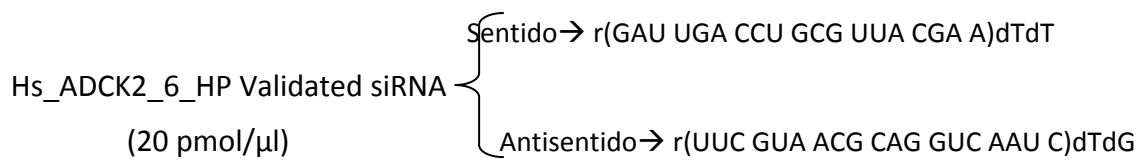
Para el conteo del número de células de un cultivo, tras despegar la monocapa de células adheridas con tripsina, las células se centrifugaron y se resuspendieron en una cantidad conocida de medio de cultivo. De forma rutinaria se hicieron dos medidas en la cámara de Neubauer a partir de 10 µl de la resuspensión.

También se observó el porcentaje de viabilidad celular en ese cultivo añadiendo a los 10 µl de cultivo, otros 10 µl de *Tripan Blue* 0,4 % (Sigma), descartando del conteo las células que resultaron estar muertas.

4.3. Transformación con ADN exógeno

4.3.1. Generación de silenciamiento transitorio de *ADCK2* mediante siRNA en líneas celulares

Para producir, en líneas celulares, el silenciamiento transitorio del gen *ADCK2*, se usó un siRNA que de forma general provocó un silenciamiento aproximado del 90 %. El siRNA utilizado fue el siguiente:



Secuencia diana: CAG ATT GAC CTG TAC GAA

El día previo al silenciamiento se sembraron por cada placa de 60 mm que se fueran a usar 350000 células, para alcanzar, al día siguiente, una confluencia aproximada de 60-70 %, óptima para el silenciamiento.

Para el silenciamiento, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en medio Opti-MEM el agente de transfección Oligofectamine (Invitrogen) y posteriormente otros 20 minutos adicionales en presencia del siRNA para formar los complejos siRNA-Oligofectamine.

Para la incubación de los complejos con las células se uso medio DMEM 0 % SFB y sin antibióticos para evitar daños a las células durante el proceso de transfección. Tras 6-7 horas el medio de cultivo con los complejos se renovó por medio DMEM 5 % SFB sin antibióticos. Las células se recogieron tras 48 horas de incubación y repartieron en tres placas de 60 mm para, al día siguiente, volver a repetir el proceso de silenciamiento. Las células se recogieron tras 72 horas tras este segundo silenciamiento, por lo que el tiempo de silenciamiento total de *ADCK2* fue de 144 horas.

Las cantidades usadas por cada placa de 60 mm fue la siguiente:

- Oligofectamine 20 μ l + Opti-MEM 120 μ l
- siRNA 20 μ l + Opti-MEM 500 μ l

4.3.2. Generación de sobreexpresión transitoria de *ADCK2* mediante ADN plasmídico en líneas celulares

Para la sobreexpresión transitoria de *ADCK2*, se clonó la secuencia de este gen en el vector de expresión en células de mamífero pcDNA 3.1/myc-His (Invitrogen) o en pEGFP-N1 (Clontech). Se sembraron 400000 células, en el caso de la línea MRC5, para alcanzar una confluencia óptima de un 80-90 % al día siguiente o la misma cantidad de células HEK293 para tener una confluencia del 40 % aproximadamente. Hay que recordar que las células HEK293 tienen un tamaño menor que las MRC5. El agente de transfección usado fue Lipofectamine 2000 (Invitrogen) que se incubó 5 minutos en Opti-MEM y posteriormente se añadió el plásmido y se incubó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante 6-7 horas con los complejos plásmido-lipofectamine y DMEM 0% SFB y sin antibióticos. El fenotipo se observó a las 48 horas.

Las cantidades usadas por cada placa de 60mm fue la siguiente:

- Lipofectamine 1 μ l + Opti-MEM 500 μ l
- Plásmido 1000 ng + Opti-MEM 500 μ l

4.3.3. Generación de sobreexpresión estable de *ADCK2* mediante el uso de partículas lentivíricas en fibroblastos.

Para la expresión estable del *ADCK2* en fibroblastos mediante el uso de partículas lentivíricas, primero se realizó la clonación del gen *ADCK2* en el vector pRRL.sin.EF1a-PGK-GFP, posteriormente se empaquetaron las partículas lentivíricas con el plásmido usando células HEK293 en su variante 293T, y finalmente se procedió a la infección de los fibroblastos con las partículas lentivíricas generadas.

4.3.3.1. Empaquetamiento de partículas lentivíricas mediante cotransfección de vectores de empaquetado en células 293T

Para la producción de las partículas lentivíricas, el día anterior se sembraron 5000000 células/placa 100 mm de la línea 293T.

Al día siguiente, tras cambiar el medio de cultivo a las células, se añaden las siguientes cantidades:

- 20 µg del vector de transferencia (pRRL-ADCK2)
- 15 µg del vector de empaquetamiento (psPAX2)
- 6 µg del vector de la cápsida (pMD2.G)
- Hasta 438 µl H₂O
- 62 µl CaCl 2M

Tras esperar 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió PBS 2X y se esperó unos 20-30 minutos. Tras esto la mezcla se añadió a las células 293T y se incubó durante 9-14 horas tras las que se cambió el medio de cultivo.

Tras 48 horas se recoge el medio de cultivo, que contiene las partículas lentivíricas empaquetadas y se filtra y centrifuga a 26000rpm 2 horas a 4°C. Se descarta el sobrenadante y las partículas se resuspenden en un volumen de 1 ml.

4.3.3.2. Obtención de líneas estables mediante transducción de las partículas lentivíricas

El día anterior a la transducción se sembraron 50.000 células/pocillo en placas de seis pocillos para alcanzar una confluencia cercana al 90 %. 30 minutos antes de la transducción se cambió el medio de cultivo a los fibroblastos para activarlos metabólicamente y posteriormente se añadió 400 µl de la solución con los lentivirus y se incubó durante 10-24 horas. Tras esto se cambió el medio de cultivo y pasadas 48 horas se observó en el microscopio de fluorescencia la expresión de GFP asociada a la de ADCK2.

Tras obtener una cantidad de células adecuada (dos frascos de 175 cm²), las células se pasaron por el “cell sorter” para separar las GFP+ de las GFP-, obteniendo una pureza en la muestra resultante del 98 %.

5. Métodos de biología molecular

5.1 Diseño de cebadores y cebadores usados

Los cebadores que fueron usados para PCR o para secuenciaciones se diseñaron mediante el programa informático Primer Premier 5.0 (Biosoft). Para los cebadores que fueron usados para la determinación de los niveles de ARNm mediante PCR a tiempo real se utilizó el programa Beacon Designer 7.0 (Biosoft).

Los cebadores utilizados se resumen en las tablas 6, 7 y 8.

5.2. Clonajes en distintos vectores

Se realizaron varios clonajes en distintos vectores tanto en bacterias, como en levaduras, como en células de mamífero. Las construcciones realizadas se encuentran resumidas en la tabla 9.

5.3 Amplificación y clonación de *ADCK2* en distintos vectores

Para la amplificación de la secuencia codificante del gen *ADCK2* se usó como molde ARN de cerebelo (Clontech) del que previamente se generó ADNc mediante RT-PCR (RevertAid M-MuL V Reverse, Fermentas). Para evitar la generación de errores en la amplificación del fragmento se utilizó la Pfu polimerasa (MBL) según las indicaciones del fabricante y se usó el programa de PCR *Touch Down* que se especifica a continuación:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	Activación	95°C	1
2	24	Desnaturalización	95°C	1
		Alineamiento	62°C (-Δ 0,5 °C/min)	1
		Extensión	72°C	2
3	6	Desnaturalización	95°C	1
		Alineamiento	50°C	1
		Extensión	72°C	2
4	1	Extensión	72°C	10

Tras la PCR la mezcla se corrió en un gel de agarosa-TBE 1 % con bromuro de etidio 0,002 % y la banda correspondiente al tamaño del *ADCK2* se extrajo y digirió con el kit comercial SpinClean Gel Extraction Kit (Mbiotech). Posteriormente fue necesario añadirle al fragmento las asas-A para poder realizar su clonaje en el vector comercial pGEM-T Easy mediante el mecanismo de asas-T. Para añadir las asas-A se incubó a 72°C durante 20 minutos la siguiente mezcla de reacción:

- 6 µl producto de PCR
- 1 µl Buffer de reacción Taq-polimerasa (MBL)
- 1 µl MgCl₂ 25 mM
- 1 µl dATP 2 mM
- 1 µl Taq-polimerasa (MBL)

Tras añadir las asas-A se procedió a la ligación con el vector pGEM-T Easy usando la ligasa y el buffer del kit siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la transformación en *E.coli DH5α* se seleccionaron las colonias positivas en placas de LB con ampicilina y X-Gal, al portar el vector el gen AMP que confiere resistencia a dicho antibiótico y el gen LacZ que da el color azul a las colonias que portan el vector vacío, seleccionándose, por tanto, las colonias blancas como presuntamente positivas para el gen *ADCK2*.

Una vez que la región codificante del *ADCK2* se encontraba clonada en pGEM-T Easy, se procedió a su subclonaje en el vector de expresión bacteriano pGEX para su sobreexpresión en *E.coli*. Para esto se utilizaron los cebadores *ADCK2_Externo*, con los que se excluía la región que está predicha como la secuencia de importación a mitocondria (MTS), al carecer *E. coli* de mitocondria. Para la extracción del ADN plasmídico de un cultivo de bacterias se utilizó el Kit comercial SpinClean Plasmid miniprep Kit (Mbiotech).

También a partir de la construcción de pGEM-T-*ADCK2* y usando los cebadores *ADCK2_Fase*, se amplificó por PCR Touch Down el *ADCK2* sin su codón de stop, subclonándolo posteriormente en el vector pYES2.1 en fase con los tag de V5 e His6X. Esto se realizó para poder posteriormente reamplificar el fragmento *ADCK2-V5-His6X* con los cebadores pcDNA y poder subclonarlo en el vector pcDNA 3.1 Myc-His

mediante las dianas de restricción que se introdujeron tras la amplificación con los cebadores. Esto se realizó para poder expresar, en células, el *ADCK2* y poder localizarlo mediante los tag de V5 e His6X.

ADCK2 se clonó también en otros dos vectores para su expresión en líneas celulares. En pEGFP-N1, amplificando el fragmento con los cebadores *ADCK2_GFP* y generando dos sitios de reconocimiento de dianas de restricción, para que el inserto quedara en fase con el gen de la GFP mejorada, para la posterior localización de *ADCK2* en el microscopio de fluorescencia confocal; y en pRRL.sin.EF1 α -PGK-GFP con los cebadores P-*ADCK2* realizando una ligación de extremos romos tras cortar, con la enzima de restricción *pmeI*, la única diana de restricción que contiene el plásmido.

5.4. Amplificación y clonación de *YPL109c* en distintos vectores

Para la clonación del gen *YPL109c* de *Saccharomyces cerevisiae* se usó como molde ADN genómico purificado de la estirpe silvestre BY4741. En este caso se clonó la secuencia del gen (con el único intrón que contiene) junto con su promotor (1003 pb) y su terminador (576 pb). Para la amplificación se procedió de forma similar al *ADCK2* con algunos cambios. Se utilizaron los cebadores *YPL109cBDcol* y el tiempo de elongación en la PCR fue de 4 minutos en vez de 2 minutos al tratarse de un fragmento de mayor tamaño. El fragmento se clonó en pGEM-T tras añadirle las asas-A de forma análoga a la clonación de *ADCK2*.

A partir de la construcción pGEMT-P.*YPL109c*.T se amplificó el fragmento P.*YPL109c*.T con los cebadores *109colPRS* y se subclonó en el vector pRS426 mediante la generación y posterior corte y ligación de los sitios de restricción para *Sall* y *NotI*. Con la versión de pRS426 se transformó la estirpe de levadura Δ *YPL109c*.

5.5. Clonación de *ADCK2* con el promotor, MTS y terminador de *YPL109c* mediante PCR recombinante

Para la clonación de *ADCK2* junto con el promotor, terminador y MTS del gen *YPL109c*, se amplificaron dos fragmentos con *ADCK2-Terminador* de *YPL109c* (*ADCK2.T*) y Promotor+MTS de *YPL109c* (P.MTS) respectivamente, que se fusionaron mediante PCR recombinante y finalmente se clonó en el vector pRS426.

Para generar el primer fragmento, ADCK2.T, se amplificaron por *Touch Down* PCR los fragmentos de ADCK2 (a partir de pGEMT-ADCK2) con los cebadores P-ADCK2 (F) y ADCK2recbTER y el terminador de YPL109c (a partir de pGEMT-YPL109c) con los cebadores 109recbTER y YPL109cBDcol (R). Para unir los dos fragmentos generados y que formaran ADCK2.T, los cebadores ADCK2recbTER y 109recbTER contenían en su extremo 5' una secuencia complementaria entre si, por lo que tras generar los dos fragmentos por separado, se pudieron unir en uno solo debido a que 21 pb de los extremos de ambos fragmentos complementaban entre si. Para esto se realizó la PCR recombinante, que tiene la característica de tener una baja temperatura de alineamiento para que así los dos fragmentos puedan unirse por las 21 pb complementarias con mayor probabilidad. El programa de PCR recombinante fue el siguiente:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	Activación	95°C	1
2	29	Desnaturalización	95°C	1
		Alineamiento	37°C	1,5
		Extensión	72°C	3
3	1	Extensión	72°C	30

Una vez generado el fragmento ADCK2.T y clonado en pYES2.1 se generó el segundo fragmento P.MTS. Para esto se realizó una *Touch Down* PCR con 1 minuto de tiempo de extensión con los cebadores YPL109cBDcol (F) y 109recbPRO (R), usando pGEMT-YPL109c como molde. Paralelamente se amplificó a partir del p.YES-ADCK2.T con los cebadores ADCK2recbPRO (F) y YPL109cBDcol (R) el fragmento ADCK2.T excluyendo el MTS del ADCK2. Para finalizar se realizó una nueva PCR recombinante con los fragmentos P.MTS y ADCK2.T (sin MTS), ya que los cebadores 109recbPRO (R) y ADCK2RecbPRO (F) contienen en su región 5' una región complementaria de 20 pb que sirve como punto de partida de la PCR recombinante una vez que se han alineado a una baja temperatura. El programa de PCR recombinante fue el mismo que en el caso anterior pero usando 4 minutos de extensión de la Taq polimerasa. Una vez generado

el fragmento P.MTS.ADCK2.T se clonó en el vector pRS426 y se transformó en la estirpe de levadura Δ YPL109c.

5.6. Generación de las estirpes con las mutaciones de los pacientes ADCK2-P1, P2 y P3 mediante mutagénesis dirigida

Para generar las estirpes de levadura transformadas con las versiones de *ADCK2* con las mutaciones de los pacientes P1/P2 (Stop) y P3 (Puntual) y las estirpes transformadas con el *YPL109c* con las mutaciones análogas a las de *ADCK2*, se recurrió a la mutagénesis dirigida a partir de las versiones previamente clonadas pRS426-YPL109c y pRS426-ADCK2. Para esto se utilizó el kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene).

Mediante una PCR en condiciones especiales y usando unos cebadores que porten en su secuencia la mutación a introducir, se pudieron generar las construcciones con las mutaciones de *ADCK2* de los pacientes y la mutación análoga en *YPL109c*. Las mutaciones introducidas en los cebadores fueron las siguientes (marcados en rojo el nucleótido cambiado y en amarillo el codón generado):

Mutación ADCK2-P1/P2

La mutación en los pacientes ADCK2-P1/P2, al tratarse de la generación de un codón de stop, se generó dicho codón y se le añadió uno más adicional cercano por si la maquinaria de traducción de la célula pudiera salvar el primero. En el caso de *YPL109c* se el fabricante recomendaba la introducción de los dos codones de stop mediante dos cebadores distintos.

Mutación ADCK2-P1,P2

En pRS426-ADCK2,

Cebador ADCK2Mut_RL → F: AGCTGA^{CT}GCCTGGGAGTTT^{TA}GCCAGGCATC

R: GATGCCTGG^{CT}TAAACTCCCAGGACT^{CA}AGCT

En pRS426-YPL09c,

Cebadores MutE → F: AAATTGGATTCCGACTATG^{TA}ATGGCTGTCTTTACCCAG

R: CTGGGTAAAGACAGCC^{TA}ATACATAGTCGGA^{CT}ACTCAATTT

Cebadores MutW2 → F: CTGTGCTGACGCAATAAATTGAATTCCGACTATGTAATGG
R: CCATTACATAGTCGGAATTCATTTATTGCGTCAGCACAG

Mutación ADCK2-P3

En pRS426-ADCK2,

Cebador MutaADCK2829 → F: CCGCTCACTGGACCTCAAAGTGGACATCC
R: GGATGTCCAGTTGAGGTCCAGTGAGCGG

En pRS426-YPL09c,

Cebador MutaYPL829 → F: GTATTGGACGCCAGTTAGATCTAAAGTGGACTTATTTGAAAG
R: CTTCAAATAAGTCCAAGTTAGATCTAAAGTGGCGTCCAATAC

Se siguieron las instrucciones del fabricante para realizar la PCR con la que se amplificaron las copias del plásmido con la mutación y posteriormente se degradaron con la enzima de restricción DpnI los vectores originales sin la mutación. Finalmente se transformó la estirpe de levadura Δ YPL109c con todas las versiones mutadas.

5.7. Análisis de los transformantes mediante PCR y corte con enzimas de restricción

Para analizar las colonias de bacterias transformadas se usaron dos técnicas; una PCR desde colonias usando un programa Touch Down y los cebadores indicados en la tabla 7 según el gen a analizar, y la digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción (Fermentas) adecuadas para cada caso. En el caso de levaduras transformadas, se analizó mediante PCR de colonias.

5.8. Secuenciación de los clonajes

Como paso final en la construcción de todas las clonaciones se procedió a la secuenciación de las colonias que resultaron positivas tras el análisis mediante PCR y enzimas de restricción. Para la secuenciación se usaron los cebadores indicados en la tabla 7. Las secuenciaciones fueron llevadas a cabo por la empresa Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Alemania).

5.9. Purificación de ADNg de levadura

Para amplificar y clonar el gen YPL109c a partir de ADNgenómico (ADNg), se purificó el ADNg según lo descrito (Philippsen & Stotz, 1991) con modificaciones. Se partió de un cultivo de 30 ml YPD a 2×10^8 células/ml. Las células se centrifugaron (siempre en frío) y resuspendieron en 3 ml de una solución 0.9 M sorbitol, 0.1 M EDTA, 50 mM DTT, pH=7.5 a la que se le añadió Zymoliasa 20T durante 90 minutos a 37°C en agitación para degradar la pared celular y obtener esferoplastos. Tras centrifugar los esferoplastos se resuspendieron en 3 ml de una solución 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH=8 y luego se le añadió 0.3 ml de SDS 10% y se incubó a 65°C durante 30 minutos. Después se le añadió 1 ml de acetato potásico 5 M y se incubó en hielo 60 minutos, tras lo cual se centrifugó a 15000 rpm 30 minutos y el sobrenadante se incubó con igual volumen de etanol absoluto y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos para obtener el pellet con el ADN, que se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en 300 µl de tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH=7.5) y se guardó a 4°C. Para eliminar la contaminación con ARN de la muestra, se trató durante 30 minutos a 37°C con 15 µl de 10 mg/ml de RNasa libre de DNasa. Finalmente se añadieron 300 µl de una mezcla fenol/cloroformo (1:1), se mezcló por inversión, se centrifugó y al sobrenadante se le añadió 15 µl de 3 M de acetato sódico y 900 µl de isopropanol, se centrifugó 10 minutos, se lavó con etanol 80 % y se secó el pellet, que finalmente se resuspendió en 100-300 µl de tampón TE.

5.10. Determinación de los niveles de ARNm mediante RT-PCR

Para la determinación de los niveles de ARNm primero se realizó la extracción del ARN, de distinta forma según el material biológico de partida. Después se generó el ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm y por último se realizó la cuantificación de la expresión de los genes por PCR a tiempo real (RT-PCR).

5.10.1. Extracción del ARN

Para la extracción del ARN a partir de un cultivo de células o de levaduras, se utilizó 1 ml de Easy-BLUE Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology). En el caso de tejidos de ratón o embriones, primero se troceó el material biológico hasta su

completa homogenización en el homogenizador Gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec) y posteriormente se usó 1 ml de TRIzol Reagent (Ambion). Posteriormente se añadieron 200 µl de cloroformo, se vortexó 15 segundos y se dejó reposando 2 minutos, tras lo que se centrifugó 15 minutos a 12000xg a 4°C y se recuperó la fase superior a la que se le añadió 500 µl de isopropanol y se congeló a -80°C durante 12 horas. Tras descongelar la muestra 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000xg a 4°C y el pellet se lavó dos veces con 1 ml de etanol 75 %. Finalmente el pellet seco de etanol se resuspendió en 50 µl de H₂O DEPC tras calentarlo a 55°C durante 10 minutos. Para eliminar contaminación con ADN, el ARN se trató con DNAsa Amplification Grade (Sigma) según las indicaciones del fabricante.

5.10.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN

La síntesis del ADNc se realizó por transcripción reversa con el iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) a partir de 1 µg de ARN según indica el fabricante. EL programa de PCR para la síntesis del ADNc fue el siguiente:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	Preparatorio	25°C	5
2	1	Activación retrotranscriptasa	42°C	30
3	1	Inactivación retrotranscriptasa	85°C	5

5.10.3. Medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

Para la medida de la expresión génica se utilizó el SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Quantace) según las instrucciones del fabricante. El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	Activación	95°C	10
2	35	Adquisición del dato al final del tercer paso	95°C	0.25
			60°C	0.5
			72°C	0.5
3	>80	Análisis de la curva de melting	95°C	1
			55°C	1
			55°C ($\Delta 0.5^\circ\text{C}/\text{ciclo}$)	0.1

La eficiencia de los cebadores se calculó a partir de la realización de una curva con distintas diluciones de ADNc. Los cebadores utilizados se encuentran recogidos en la tabla 8. Para calcular la expresión relativa final se usó el método de $2^{-\Delta\Delta C_P}$ (Pfaffl, 2001).

5.10.4. Cuantificación de ARN/ADN

Las extracciones de ARN y también las de ADN plasmídico se cuantificaron espectrofotométricamente en el Nanodrop ND-1000. Las muestras siempre tuvieron un ratio 260 nm/280nm entre 1.6-2.0 para el ADN y entre 1.8-2 para el ARN. Adicionalmente para controlar que el ARN no estaba degradado se corrió en un gel de agarosa-TBE 1 % 0.5 µg de ARN para observar las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos.

6. Métodos bioquímicos

6.1. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas existente en una muestra se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se usó el reactivo BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad) junto a la muestra a determinar en presencia de NaOH y se midió la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína se pudo inferir a partir de la construcción de una recta de calibrado realizada a partir de concentraciones conocidas de γ -globulina.

6.2. Extracción de proteínas a partir de células

Para la extracción de proteínas a partir de células enteras, se recogió el material celular presente en un frasco de 75 cm². Tras recoger las células, centrifugarlas y lavarlas con PBS, se incubaron con la siguiente mezcla en un volumen final de 200 μ l:

- 0.2 μ l DTT 1M
- 0.5 μ l PMSF
- 4 μ l CIP (50X)
- 2 μ l CIF (100X)
- 193.3 μ l Tampón RIPA (Santa Cruz)

Tras añadir la mezcla, la muestra se vorteoó 10 segundos y se centrifugó a 12.000xg durante 5 minutos, tras lo cual se recogió el sobrenadante con las proteínas.

6.3. Resolución de muestras de proteínas en SDS-PAGE y visualización mediante tinción de plata y tinción con Azul de Coomassie

Para la separación por peso molecular de las muestras de carácter proteico, éstas se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se prepararon mini-geles de 1,5 mm de acrilamida (Bio-Rad) generalmente al 12,5 %, variando el porcentaje según el tamaño de la proteína, con un gel empaquetador de acrilamida al 4 %. La electroforesis se realizó en un sistema Mini Protean III (Bio-Rad) a una intensidad constante de 35 mA.

Para la visualización de proteínas en un gel de acrilamida se usaron dos técnicas, la tinción con Azul de Coomassie y la tinción con plata. Para la primera se usó una solución de tinte (Coomassie Brilliant Blue (Sigma) 0.1 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) durante unas 4 horas y posteriormente se destiñó el gel con una solución de desteñido (ácido acético 10 %, metanol 40 %) durante 12 horas.

Para la tinción con plata el gel se incubó 12 horas con solución de fijación (metanol 50 %, ácido acético 12 %, formaldehído 0.0185 %), tras lo cual se realizaron tres lavados de 20 minutos con etanol 50 %, un pretatamiento de 1 minuto con tiosulfato sódico 0.02 % y la tinción con la solución de impregnación (nitrato de plata 0.1 %, formaldehído 0.0278 %) durante 20 minutos. Para teñir el gel y poder observar las bandas de proteína, primero se realizaron 3 lavados de 20 segundos con agua destilada y después, en oscuridad, se incubó con solución de revelado (carbonato sódico 3 %, tiosulfato sódico 0.0002 %, formaldehído 0.0093 %). Cuando las bandas se apreciaron lo suficiente, se paró el revelado con dos lavados de 2 minutos con agua destilada y una solución de bloqueo (metanol 50 %, ácido acético 12 %) durante 10 minutos. Finalmente se lavó el gel con metanol 50 % durante 20 minutos para después dejarlo en metanol 5 % para su uso posterior.

6.4. Inmunotinción de geles de acrilamida

A partir de un gel de acrilamida en el que se haya realizado la electroforesis de muestras proteicas se realizó una electrotransferencia, para la que se usaron membranas de nitrocelulosa (Amersham-Pharmacia) humedecidas en tampón de transferencia (Tris base 48 mM, Glicina 39 mM, metanol 20 %, pH 9-9.4) y se realizó en el sistema Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad), a voltaje constante de 25 V durante 1 hora. Para validar la electrotransferencia, se realizó una tinción de la membrana con el colorante Rojo Ponceau 0,5 % durante 5 minutos y posteriormente se destiñó con ácido acético al 1 %.

Previamente a la inmunotinción, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween20 0,05 %) al que se le añadió 5 % de Blotting Grade Blocker non-fat dry milk (Bio-Rad) durante 1 hora. La membrana entonces fue incubada con los anticuerpos durante 12 horas a 4°C en el caso de los

anticuerpos primarios y durante 1 hora a temperatura ambiente en el caso de los secundarios. Los anticuerpos secundarios estaban marcados con peroxidasa de rábano (HRP) y para su revelado se utilizó el ECL LuminataTM classico o forte (Millipore) pudiéndose visualizar el resultado en el ChimiDocTM XRS+ (Bio-Rad). Los anticuerpos utilizados y sus características se recogen en la tabla 10.

6.5. Purificación de la proteína recombinante ADCK2 en bacterias mediante cromatografía de afinidad.

A partir de la clonación de la secuencia codificante de ADCK2 en el vector pGEX se pudo purificar dicha proteína mediante cromatografía de exclusión molecular. La amplificación a partir de pGEMT-ADCK2 se realizó con los cebadores ADCK2_Externos y el producto generado se clonó en pGEX mediante la generación de los sitios de restricción para BamHI y Sall. Con el uso de estos cebadores se excluyó la región predicha como MTS de ADCK2 y se clonó en fase con el *tag* de GST y se transformó en *E. coli* BL21. A partir de un preinóculo de 50 ml se preparó un cultivo de 550 ml a D.O_{600nm}=1 al que se le añadió IPTG 1 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína y etanol absoluto 2 % (v/v) para inducir la expresión de chaperonas y facilitar así un correcto plegamiento de las proteínas recombinantes durante 4 horas a 18°C en agitación. Tras recoger las bacterias, se procedió a su rotura en tampón GST (Tris-HCl 0.1 M pH=8, NaCl 0.2 M al que se le añade β-mercaptoetanol 15 mM y pefabloc 1 mM en el momento de la rotura, y tras unos minutos lisozima 1:2000 p/v, EDTA 0.6 M, pefabloc 0.25 mM, LBTI 0.5 mM y Tritón-X-100 1:2000 v/v) durante 12 horas a -80°C. Tras la rotura se procedió a la eliminación del ADN con ADNasa (Sigma) y MgCl₂ 7.5 mM 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó 45 minutos a 12000xg tras lo que se recogió el sobrenadante con las proteínas recombinantes y se le añadió 3 ml de bolitas de glutatión sefarosa (GST) (GE Healthcare) durante 12 horas a 4°C en agitación. Se centrifugó a 700xg para separar las bolas de sobrenadante y las bolas se sometieron a una cromatografía de afinidad, en la que en una columna se eluyó el ADCK2-GST unido a las bolitas por adicción de 12 ml de tampón de elución (Tris-HCl 0.1 M pH=8, NaCl 0.2 M, glutatión reducido GSH 1:3000 p/v), donde el GSH compite por afinidad con el ADCK2-GST unido a las bolas provocando su elución. Finalmente para concentrar la proteína y eliminar el GSH se sometió el eluido a un

proceso de diálisis en una solución con glicerina 50 %, MOPS-NaOH 50 mM pH=7, β -mercaptoetanol 4.5 mM, pefabloc 0.1 mM, durante 12 horas a 4°C en agitación. Finalmente la solución dializada se guardó a -20°C hasta su uso.

6.6. Validación de la purificación de ADCK2 recombinante mediante espectrometría de masas y determinación de su concentración

La banda teórica de ADCK2 recombinante obtenida a partir de un gel de acrilamida con tinción de plata se recortó y se analizó mediante espectrometría de masas y el análisis MASCOT en el servicio SCAI de la Universidad de Córdoba.

La concentración de ADCK2-GST se calculó a partir de generar una recta de calibrado con concentraciones conocidas de BSA y la cuantificación de las bandas con el programa informático ImageLab.

6.7. Ensayo de la función quinasa “*in vitro*”

Para la medida de la actividad quinasa de una proteína se realizó un ensayo “*in vitro*” para el que se preparó la siguiente mezcla:

- 2 μ l Buffer quinasa 10X (Tris-HCl 50 mM, β -glicerol fosfato 25 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM, DTT 1 mM)
- 0.3 μ l Sustrato fosforilable (2.5 mg/ml)
- 0.2 μ l ATP (20 mM)
- 0.5 μ l [γ -³²P]ATP (Perkin Elmer)
- 1 μ l proteína quinasa (0.01 μ g/ μ l)
- Hasta 20 μ l de H₂O miliQ

Como sustratos susceptibles de ser fosforilados se usaron histonas (Sigma), fosvitina (Sigma), y MBP (Sigma). Como quinasas control comerciales se usaron PKC (Calbiochem) y CDK (NE-Biolabs). Se incubó durante 30 minutos a 30°C y posteriormente se corrieron las muestras en un gel de acrilamida que posteriormente fue secado en el secador de geles e incubado un mínimo de 12 horas en un casete de exposición (Molecular Dynamics). Tras la exposición, la placa de exposición se reveló en el Typhoon 9410.

6.8. Métodos de subfraccionamiento celular

Se usaron diversas técnicas de fraccionamiento celular según el material de partida. Para la purificación de mitocondrias de levaduras se siguió el método de Glick (Glick & Pon, 1995) y para el caso de células humanas o de ratón se siguió el proceso descrito en (Frezza, Cipolat, & Scorrano, 2007) con algunas modificaciones.

6.8.1. Purificación de mitocondrias en levaduras

Tras recoger el cultivo de levadura, se resuspendió en 3.5 ml tampón A (Tris-SO₄ 100 mM pH=9.4, DTT 10 mM) por cada gramo de peso fresco y se incubó durante 30 minutos en agitación a 100 rpm a 30°C para reducir los puentes disulfuro. Después se centrifugó (siempre en frío) y se resuspendió en 2 ml de tampón B (KPi 20 mM pH=7.4 y sorbitol 1,2 M) por cada gramo de peso fresco, añadiendo además 5mg de Zymoliasa 20T (Seikagaku Corporation), para degradar la pared celular y obtener los esferoplastos, y se incubó durante 90 minutos a 30°C en agitación a 100 rpm. Los esferoplastos se centrifugaron a 4000xg durante 5 minutos y el pellet se lavó con 10 ml de tampón B, tras lo cual se resuspendió en 10 ml de tampón C (K-MES 1 M pH=6, sorbitol 2.4 M) al que se le añade 100 µl de PMSF 100 mM como inhibidor de proteasas y se procedió a la rotura de los esferoplastos en un homogenizador Dounce (vidrio-vidrio) mediante 100 golpes. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 2000xg y se recogió el sobrenadante, eliminándose los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 12000xg durante 15 minutos y se recogió el pellet que es la fracción enriquecida en mitocondrias. Estos dos últimos pasos se vuelven a repetir con 10 ml de tampón C para obtener un pellet con las mitocondrias crudas con una mayor pureza. Finalmente el pellet obtenido se resuspendió en 0.5 ml de tampón C.

6.8.2. Subfraccionamiento celular y purificación de mitocondrias en células humanas

Se partió de un cultivo de células HEK293 en tres placas de 500 cm² confluentes. Tras lavar con PBS, las células se levantaron, en frío sobre hielo, con un raspador tras añadir a cada placa 4 ml de tampón IBC (Tris-MOPS 0.1 M, EGTA/Tris 0.1 M pH=7.4, sacarosa 1 M, inhibidor de proteasas y fosfatasa 1X) y se terminó de lavar cada placa con otros 4 ml de tampón IBC. Se centrifugó a 600xg 10 minutos a 4°C (todas las

centrifugaciones fueron en frío) y se resuspendió en 5 ml de tampón IBc. Para la rotura suave de las células se dieron 50 golpes a 1600 rpm con el homogenizador automático y luego se centrifugó a 700xg durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante que se volvió a centrifugar a 7000xg durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 100000xg durante 45 minutos, resuspendiéndose el pellet en nuevo tampón IBc y centrifugando de nuevo a 100000xg 30 minutos obteniéndose el sobrenadante como la fracción enriquecida en citosol, y el pellet como la fracción enriquecida en retículo endoplasmático (RE). El pellet de la centrifugación anterior a 7000xg se resuspendió en 1 ml de tampón IBc y se volvió a centrifugar a 7000xg, obteniéndose la fracción enriquecida en mitocondrias al resuspender el pellet en 0.3 ml de tampón IBc.

6.8.3. Subfraccionamiento celular y purificación de MAMs en hígado de ratón

Para la obtención de una fracción enriquecida en membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) se partió de hígado de ratón como material de partida. El proceso fue similar al caso de células humanas pero con algunos cambios. El tejido debió ser troceado y lavado con tampón IBc varias veces para eliminar la sangre y se dieron 60 golpes con el homogenizador automático. Tras centrifugar a 1000xg y eliminar los restos celulares, el sobrenadante se centrifugó a 10000xg 10 minutos. El sobrenadante se procesó de igual forma que en células y se obtuvieron las fracciones de citosol y RE. El pellet se volvió a centrifugar a 10000xg otros 10 minutos para lavarlo y se resuspendió en 200 µl de tampón IBc, tras lo que se puso en un gradiente de Percoll al 30 % y lo centrifugo a 95000xg durante 30 minutos obteniéndose la fracción enriquecida en mitocondrias y algo más arriba la fracción enriquecida en MAMs. Ambas fracciones se centrifugaron por separado a 6500xg 10 minutos para proceder a su lavado.

6.8.4. Determinación de la localización submitocondrial mediante ensayo con proteinasa K

A partir de la fracción enriquecida en mitocondrias obtenida en el subfraccionamiento celular se procedió a la degradación secuencial de las proteínas mitocondriales. Siempre a partir de 100 mg de fracción mitocondrial no congelada previamente, se realizaron cuatro tratamientos de forma paralela durante 30 minutos

a 4°C. En el primero se añadió 1 ml de tampón IBc con inhibidores de proteasas y fosfatasa, en el segundo se añadió 1 ml de tampón IBc sin inhibidores de proteasas y fosfatasa, en el tercero 1 ml de tampón HEPES 2 mM pH=7.4 y en el cuarto 1 ml de tampón HEPES 2 mM pH=7.4 y Triton Tx100 1 %. A los tratamientos 2, 3 y 4 se añadieron además 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Tras la incubación de 30 minutos a 2, 3 y 4 se le añadieron inhibidores de proteasas 1X y 12.5 µl de PMSF 2 mM. En las cuatro fracciones se añadió 150 µl de TCA 100 % para precipitar las proteínas y se incubó 30 minutos en hielo, tras lo que se centrifugó 30 minutos a 16000xg y el pellet se lavó con 0.5 ml de acetona y se volvió a centrifugar 30 minutos a 16000xg, tras lo cual se secó el pellet por evaporación de la acetona y finalmente se añadieron 40 µl de tampón de carga de proteínas LB.

6.9. Cuantificación de compuestos quinónicos a partir de muestras complejas

Se cuantificaron los niveles de CoQ₁₀ totales o la tasa de síntesis de CoQ₁₀ a partir del precursor pHB marcado radiactivamente.

6.9.1. Síntesis de pHB radiomarcado

Se partió de L-[¹⁴C]Tirosina que se secó en el Speed-Vac tras diluirla en 5 ml de una solución de etanol al 2 %. Después de añadió 17.5 µl de NaOH 10 M y 25 µl KOH 10 M, se agitó en vortex y se congeló en N₂ líquido, tras lo cual se liofilizó durante 48 horas. La reacción de síntesis se hizo sumergiendo el tubo en un baño de arena a 270°C con un vaso conteniendo PEG-400 (Panreac) durante 5 minutos. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente, al tubo se le añadió 400 µl de H₂SO₄ al 25 % para resuspender. El [¹⁴C]pHB se extrajo con 800 µl de acetato de etilo tres veces, vorteadando un minuto y centrifugando 5 minutos a 4°C a 1000xg, recuperándose la fase superior con el acetato de etilo. El acetato de etilo se lavó tres veces con H₂O destilada y se secó en el Speed-Vac. Finalmente el [¹⁴C]pHB se resuspendió en 200 µl de etanol quedando a una concentración final de 2.588 mM. La pureza y el rendimiento se calcularon por TLC con isopropanol:hidróxido amónico:agua 8:1:1 como fase móvil, obteniéndose un rendimiento del 30 % y una pureza del 95 %.

6.9.2. Cuantificación de la tasa de síntesis de CoQ₁₀ a partir de pHB radiomorado

Para medir la tasa de síntesis de CoQ₁₀ se partió de un frasco con células de 175 cm² al 80 % de confluencia en el caso de fibroblastos o de 5 placas confluentes de 60 mm en el caso de líneas celulares. Se le añadió medio de cultivo con [¹⁴C]pHB (12000 DPM/ml cultivo que equivale a 0.1926 nmoles) y se incubó durante 48 horas, excepto en el caso de los silenciamientos transitorios que la incubación fue de 72 horas. Posteriormente se procedió a la cuantificación de la cantidad de [¹⁴C]CoQ₁₀.

6.9.3. Extracción de compuestos quinónicos a partir de muestras complejas

En el caso de tener levaduras como material de partida, se hizo a una purificación de las mitocondrias previamente y se realizó la extracción de CoQ₆ a partir de 0.5 mg en un volumen de 0.5 ml. En el caso de células se hizo la extracción del total del material, midiendo antes la concentración de proteína para poder estandarizar la cantidad de CoQ₁₀ al final del proceso. La muestra se llevó a 0.5 ml con PBS 1X y se añadió 500 ng de CoQ₉ como estándar interno. A los 0.5 ml se añadió 0.5 ml de SDS 2% y se agitó con vortex 1 minuto. Se añadieron otros 2 ml de una mezcla de etanol:isopropanol y se agito en vortex otro minuto. Posteriormente se realizaron tres extracciones con 4 ml de hexano agitando en vortex 1 minuto y centrifugando a 4°C a 1000xg 5 minutos, recuperándose la fase orgánica superior con los lípidos presentes en la muestra. Los 12 ml de hexano recuperados se secaron en el rotavapor y el residuo se resuspendió en 1 ml de etanol. El etanol finalmente se secó en el Speed-Vac y el residuo se resuspendió en 60 µl de etanol (Santos-Ocana et al., 2002).

6.9.4. Cuantificación de los compuestos quinónicos en muestras complejas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC)

A partir de la muestra obtenida tras la extracción de los compuestos quinónicos, éstos se cuantificaron de dos formas distintas, según si la muestra contenía material radiactivo o no.

De forma general se usó la separación de los compuestos por HPLC. Este proceso lo llevó a cabo en la empresa Selten Diagnosis. Se usó una columna de fase reversa Kromasil C-18 termostatizada a 40°C acoplada a un detector ultravioleta en serie Diode

Array 166 (Beckman Coulter) y un detector electroquímico (ESA Coulochem III). La célula guarda se situó tras el inyector a +500 mV y la célula analítica a E1= -500 mV y E2 = +500 mV. La fase móvil estaba compuesta por metanol:etanol:isopropanol 704:192:80 con perclorato de litio a 1.38 mM a un flujo constante de 1 ml/min. Se realizaron dos repeticiones de 20 µl de muestra. Como estándar externo se utilizó el mismo analito que se quiso determinar. El cromatograma se analizó mediante el software 32 Karat 5.0 (Beckman Coulter).

Para las muestras procedentes de la incubación con pHB radiomarcado se realizó una separación por TLC. La muestra completa se cargó en una placa de TLC (Merck Silica Gel F254 20x10 cm) paralelamente a 10 µl de CoQ₁₀ 1 mM como estándar externo. Como fase móvil se utilizó hexano:éter 90:20 y la placa se tiñó tras incubarla con cristales de yodo. Finalmente tanto la fracción de sílica que contuvo el CoQ₁₀ como la de los demás compuestos derivados del [¹⁴C]pHB se midieron en el contador de centelleo tras añadir 2 ml de líquido de contador de centelleo.

6.10. Determinación de la actividad del ciclo de la β-oxidación de los ácidos grasos

La determinación se realizó según se describe (Dutta et al., 2009; Singh, Usher, Johnson, & Poulos, 1990) con modificaciones. Se recogieron las células de un frasco de 75 cm² y se incubaron en tampón hiposmótico (HEPES 2mM pH=7.4 , MgCl₂ 0.15 mM, 10 mM KCl 10 mM, EGTA 0.5 mM) durante 10 minutos en hielo para aumentar la turgencia celular. Posteriormente tras centrifugar las células a 4°C se incubó en 0.2 ml de tampón de homogenización (tampón hiposmótico + sacarosa 0.25 M e inhibidor de proteasas 1X) y se sonicó durante 5 segundo a 60 % de potencia en el sonicador (Bandelin Sonoplus). En el caso de levaduras la rotura se realizó con bolas de vidrio en vez de con el sonicador. Se centrifugó 5 minutos a 600xg a 4°C y para el ensayo se usaron 50 µg de proteína del sobrenadante en un volumen de 25 µl con Tris-HCl 50mM pH=8. La mezcla de reacción consistió en los 25 µl de muestra, 20 µl de una solución core 10X (Tris HCl 50 mM pH=8, NaCl 40 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 2 mM), 50 µl de una solución preparada en el momento de uso (DTT 1 mM, ATP 5 mM, L-Carnitina 0.2 mM, NAD 0.2 mM, FAD 0.06 mM, CoenzimaA 0.12 mM, α-ciclodextrina 3 mM) y H₂O

destilada hasta un volumen final de 0.2 ml. A la mezcla de reacción se añadió 0.1 μ Ci [14 C]ácido palmítico y se incubó a 37°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo con 0.2 ml de ácido perclórico 0.6 M. El ácido palmítico no degradado se extrajo mediante tres extracciones con hexano tras usar el vortex 15 segundos y centrifugar 1 minuto a 1000xg. Finalmente las fracciones, tanto la del ácido palmítico no degradado como del degradado, se midieron en el contador de centelleo.

6.11. Determinación de los niveles de L-lactato en medio de cultivo de células

Para la determinación de la cantidad de L-lactato en el medio de cultivo celular se utilizó el kit Enzymatic Determination of L-Lactate (Randox). Se sembraron 25000 células en pocillos de una placa de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo. La confluencia aproximada de partida fue de un 40 % para, tras 168 horas de duración del experimento, las células quedaran a una confluencia del 100 %. Se midió la cantidad de lactato utilizando un pocillo distinto cada, aproximadamente, 24 horas. De cada muestra se determinó la cantidad de lactato y se estandarizó por el número de células, tras contarlas también. La cantidad de lactato medido se estandarizó también con una muestra con solo medio de cultivo del mismo tiempo de incubación que la muestra con células.

6.12. Localización subcelular de *ADCK2* mediante inmunofluorescencia

La localización se realizó en células HEK293, que se sembraron a una confluencia aproximada del 40 % en una placa de 60mm con cubres para su posterior manipulación. Al día siguiente se realizó la transfección con el vector pEGFP-*ADCK2*, usando lipofectamine 2000 (invitrogen) como agente de transfección, de igual forma a la descrita en el punto 4.3.2. “Generación de sobreexpresión transitoria de *ADCK2* mediante ADN plasmídico en líneas celulares”.

Tras 48 horas se recogieron los cubres y se procedió a su marcaje mitocondrial mediante inmunofluorescencia. Para esto, primero las células fueron fijadas con paraformaldehído 3.8 % durante 15 minutos en agitación. Posteriormente se permeabilizaron las células con saponina 0.1 % durante 10 minutos en agitación. Tras realizar 3 lavados con PBS/Tween20 0.05 %, se realizó un bloqueo al poner el cubre

sobre una gota de 50 µl de PBS/suero de burro 10 % (misma especie que en la que se produjo el anticuerpo secundario usado) durante 20 minutos. Tras lavar con PBS se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-Tom20 (Santa Cruz) sobre una gota de 50 µl de PBS a una concentración 1:50 durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se realizaron tres lavados con PBS/Tween20 0.05 % y se procedió de igual forma que con el anticuerpo primario, con el anticuerpo secundario anti-conejo (Calbiochem) a una concentración de 1:100. Finalmente se realizaron tres lavados con PBS/Tween20 0.05% y se tiñeron los núcleos con un lavado con DAPI (Invitrogen) 0.5µg/ml durante 1 minuto. Los cubres se montaron en un porta sobre una gota de medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories) sellándolos con laca de uñas. Las muestras se observaron en el microscopio confocal LEICA DM2500 usando el programa informático LASAF.

6.13. Determinación de las actividades de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

La determinación de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria en levaduras se realizó a partir de 50 µg de proteína de mitocondrias purificadas como se describe en el punto 6.8.1 del presente apartado el mismo día de la medida de las actividades de los complejos respiratorios. En el caso de fibroblastos, las muestras se procesaron como se describe en (Frazier and Thorburn 2012) antes de medir las actividades de los complejos.

En el caso de los fibroblastos, se recogieron las células a partir de cuatro frascos de 175 cm² confluentes y se procedió a su rotura en 1 ml de tampón MegaFb (2 mM HEPES-K⁺ pH=7.4, 0.1 mM EGTA, 250 mM sacarosa) con 20 golpes en un homogenizador de vidrio con pistón de teflón a 1000rpm. Tras centrifugar a 600xg durante 10 minutos a 4°C se recuperó el sobrenadante y se repitió todo el proceso con una segunda rotura con el pellet obtenido. Tras mezclar los dos sobrenadantes obtenidos, se centrifugó a 14400xg 10 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 400µl de tampón MegaFb. 200 µl de esos 400 µl se volvieron a centrifugar 14400xg 10 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 1ml de tampón hipotónico (25 mM KPi pH=7.2, 5 mM Cl₂Mg) tras lo cual se volvió a centrifugar a 14400xg 10 minutos a 4°C y

el pellet se resuspendió en 200 μ l. Finalmente las dos muestras con 200 μ l cada una se congelaron en hielo seco-etanol y se descongelaron en agua fría tres veces. La muestra sometida al tampón hipotónico se usó para medir el complejo I y la no sometida al tampón hipotónico para medir los complejos II+ III y III. Para la medida en fibroblastos se utilizaron 50 μ g de proteína de muestra.

6.13.1. Actividad del complejo I (NADH-DCIP reductasa)

La actividad se determinó midiendo la caída de la DO_{600nm} por la reducción del dicloro-fenol-indofenol (DCIP) tras añadir NADH como sustrato. La muestra fue incubada en tampón de reacción (fosfato sódico 40 mM pH 7,4) y con DCIP 75 μ M. Tras un minuto de incubación la reacción fue iniciada tras añadir NADH 200 μ M.

6.13.3. Actividad del complejo III (decilubiquinona-citocromo c reductasa)

La actividad se determinó midiendo el aumento de la DO_{550nm} por la reducción del citocromo c tras añadir decilubiquinona como sustrato. La muestra fue incubada en tampón de ensayo (fosfato sódico 40 mM pH 7,4) conteniendo decilubiquinona reducida 50 μ M, citocromo c 30 μ M y cianuro potásico 250 μ M a 30°C. La reacción fue iniciada con la adición de decilubiquinona tras un minuto de incubación, tanto en presencia como en ausencia de antimicina.

6.13.4. Actividad del complejo I+III (NADH-citocromo c reductasa)

La actividad se determinó por el aumento en la DO_{550nm} debido a la reducción del citocromo c tras añadir NADH. La muestra fue incubada en 1 ml de tampón de ensayo (fosfato sódico 40 mM pH 7,4 y cianuro potásico 250 μ M) a 30°C en presencia y ausencia de antimicina. Tras añadir el citocromo c, la muestra fue incubada en el tampón de ensayo y tras un minuto se le añadió el NADH.

6.14. Determinación de la autofagia y mitofagia en cultivos celulares

Para la determinación de la autofagia y mitofagia se sembró un frasco de 75 cm² a una confluencia aproximada del 70 %. Tras 24 horas se cambió el medio de cultivo y tras otras 48 horas se recogieron las células y se realizó una extracción de proteínas totales como se explica en el punto 6.2. y se determinó la autofagia y mitofagia por

inmunotinción usando anti-Tom20 como marcador mitocondrial y por tanto de mitofagia y anti-LC3 como marcador de autofagia.

7. Cálculos estadísticos

En cada experimento se realizaron un mínimo de tres repeticiones biológicas y en cada repetición biológica se realizaron entre una y tres repeticiones experimentales. Como medida de la dispersión de los datos se utilizó el error estándar. Para determinar diferencias significativas entre grupos se utilizó el test estadístico t de student, indicándose en el pie de figura de cada caso la significancia del valor P.

Tabla 6. Cebadores usados para clonajes.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Molde	Dianas de restricción	Finalidad
P-ADCK2	F: CTCGGGAGGATGGTGG R: GGCTCTTGGGAGTGGC	ADCK2 (ADNc)	---	Clonaje en pGEM-T Easy y en pRRL
ADCK2_Externo	F: GGTGGATCGCCCTGACGTTCTGAG R: CAGTCGACGGCTCTTGGGAGTGGC	pGEM-T-ADCK2	BamHI Sall	Subclonaje en pGEX
ADCK2_Fase	F: CTCGGGAGGATGGTGGCG R: CGGGGGGCACACTGGG	pGEMT-ADCK2	---	Subclonaje en pYES 2.1
pcDNA	F: CTCGATATCATGGTGGCGCCCTGG R: CCTGGGGCCGCTCAATGGTGATGGT	pYES-ADCK2-V5-His6X	NotI EcoRV	Subclonaje en pcDNA
ADCK2_GFP	F: GAGGCTAGCATGGTGGCGCCC R: GGATCCAGCGGGGGGCACACTGGG	pGEM-T-ADCK2	NheI BamHI	Subclonaje en pEGFP-N1
YPL109cBDcol	F: TTTCTGCAGTACGGCGAGGCGATGACTTC R: GACGGGCCCACTCTGGAATGCGATGATTGGC	YPL109c (ADNg)	PstI ApaI	Clonaje en pGEM-T Easy
ADCK2recbTER	R: ATAAAAGATGCATAAAAAAGAAATATACACGGGGGCACACTGG GCCCC	pGEM-T-ADCK2	---	PCR recombinante ADCK2 con promotor, terminar y MTS de YPL109c
109recbTER	F: CTCCTCACGGGCCAGTGTCGCCCCCGTGATATTCTTCTTT TTATGCAT	pGEM-T-P.YPL109c.T	---	PCR recombinante ADCK2 con promotor, terminar y MTS de YPL109c
ADCK2recbPRO	F: ACTATAGCAAGTCCACACGGGGTGAGGGGGC	pYES-ADCK2.T	---	PCR recombinante ADCK2 con promotor, terminar y MTS de YPL109c
109recbPRO	R: CGTCAGGGGCCCCCTCACCCCGTGTGGACTT	pGEM-T-P.YPL109c.T	---	PCR recombinante ADCK2 con promotor, terminar y MTS de YPL109c
109colPRS	F: TTTGTGACTACGGCGAGGCGATGACTTC R: TTGGCGGCCGCACTCTGGAATGCGA	pGEM-T-P.YPL109c.T pYES-P.MTS.ADCK2.T	Sall NotI	Clonaje de YPL109c y ADCK2 con promotor, MTS y terminador en PRS416

Tabla 7. Cebadores usados para detección en PCR/secuenciación y mutagénesis.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen diana	Finalidad
ADCK2_Interno	F: CCCTCCTACTCTCTACCC R: TCCACAATCTCAGGCAAG	ADCK2	Detección/secuenciación de ADCK2
ADCK2_Race	F: CATACGCCAACACTGCCTTCTGGA R: CCAGGACTCGGCTGCCAATCTTCAT	ADCK2	Detección/secuenciación de ADCK2
YPL_interno	F: CTGTGCTGACGCAATAAA R: CCTGATCTTGGTCCTCT	YPL109c	Detección/secuenciación de YPL109c
YPL_Race	F: TCCGACTATGGAATGGCTGCTTTACCC R: CCTCTATCTTCTTCCTCAGGTCGTGCGT	YPL109c	Detección/secuenciación de YPL109c
YPLproINT	F: ATCGCGTTCTTGATTGT R: TATTCTGTGAGGGTTTGA	YPL109c (Promotor)	Detección/secuenciación del promotor de YPL109c
YPLpro	F: ATTACGGCGAGGCGATGA R: AAACGCGCGTGCCAGATGGTT	YPL109c (Promotor)	Detección/secuenciación del promotor de YPL109c
SP6/T7	F: ATTAGGTGACACTATAG R: TAATAGCACTCACTATAGGG	pGEM-T Easy	Detección/secuenciación a partir de pGEM-T Easy
Gal1/V5	F: AATATACCTCTATACTTTAACGTC R: ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT	pYES 2.1	Detección/secuenciación a partir de pYES 2.1
MutE	F: AAAATTGGATTCGACTATGTAATGGCTGTCTTTACCCAG R: CTGGGTAAAGACAGCATTACATAGTCGGAACCTCAATTT	Ypl109c	Mutagénesis de YPL109c
MutW2	F: CTGTGCTGACGCAATAAATTGAATCCGACTATGTAATGG R: CCATTACATAGTCGGAATTCAAATTTATTGCGTCAGCACAG	YPL109c	Mutagénesis de YPL109c
ADCK2Mut_RL	F: AGCTGAGTCTCGGGAGTTTAGCCAGGCATC R: GATGCTGGCTAAACTCCAGGACTCAGCT	ADCK2	Mutagénesis de ADCK2
MutaYPL829	F: GTATTGGACGCCAGTTAGATCTAAACTTGGACTTATTTGAAAG R: CTTTCAAATAAGTCCAAAGTTTAGATCTAACTGGCGTCCAATAC	YPL109c	Mutagénesis de YPL109c
MutaADCK2829	F: CCGCTCACTGGACCTCAAACCTGGACATCC R: GGATGTCAGTTTGAGGTCAGTGAGCGG	ADCK2	Mutagénesis de ADCK2

Tabla 8. Cebadores usados para PCR a tiempo real

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen diana	Organismo
GAPDH	F: TGCACCACCACCTGCTTAGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	GAPDH	Homo sapiens
Coq2	F: CTATTCTGATGCGTGGAG R: CGATTGGCTGTTCTTGTA	Coq2	Homo sapiens
Coq3	F: TGAACCTCTAGGGCGGCTTG R: TCCAGGGAACACACTCTGTACTC	Coq3	Homo sapiens
Coq4	F: CTGTCCTCCGTCGGCTCTG R: GCGGTGTCCTGTGGTCTCC	Coq4	Homo sapiens
Coq5	F: ATTCTTTGGGCGGCTCTCG R: GGGCAGTTCTTCAGCATCTCC	Coq5	Homo sapiens
Coq6	F: GTCTGCTGTTGTGGCTACTCTG R: GGACCAAAACCAAGGAACAAGG	Coq6	Homo sapiens
Coq7	F: AGTTCTGATGCCCTTGTG R: GTTGTAGTGATGTGCTATGC	Coq7	Homo sapiens
Coq8	F: CAGGGTCAGGATAAACAT R: GACTGAGAAAGTGGAATC	Coq8	Homo sapiens
Coq9	F: GCGAGGAGGAGGAGACTATG R: GCGGGGCACAAACTCAAGG	Coq9	Homo sapiens
ADCK2_BD7	F: CAGGAAGAACACCATCAC R: TGAGTCATCAGCAACTTAA	ADCK2	Homo sapiens

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Gen diana	Organismo
hPTC7	F: GGCGGCGACTACGGACTG R: CTCTCCAGCCTCCTACACCATC	PPTC7	<i>Homo sapiens</i>
OGDH2	F: AACAGATTCCGGTGCTATT R: TACATCTCCTCCACATAGT	Oxoglutarato deshidrogenasa	<i>Homo sapiens</i>
HADH	F: AGACATTGACACTGCTAT R: ATGAACTTCGTAGTATCCA	Hidroxilaci CoA deshidrogenasa	<i>Homo sapiens</i>
HPRT1_Nuevo	F: TGATTATGGACAGGACTGA R: TCATAGGAATGGATCTATCACT	HPRT1	<i>Mus musculus</i>
ADCK2_rt_MOUSE	F: TAAGTCAGATCACCTCAT R: CAATCTTCATCAGCAGTA	ADCK2	<i>Mus musculus</i>
YACT1	F: CGCTCCTCGTGCTGTC R: TGTAGAAAGGTATGATGCCAGAT	ACTINA	<i>Saccharomyce cerevisiae</i>
YPL_BD7	F: AACATTATATCCTCCGAACTTGA R: ATCTTGGTCTCCTCTATCTT	YPL109c	<i>Saccharomyce cerevisiae</i>

Tabla 9. Construcciones y plásmidos utilizados

Nombre	Vector	Características	Huésped	Cebadores utilizados
pGEM-T Easy-ADCK2	pGEM-T Easy (Promega)	Para el almacenamiento de la secuencia de ADCK2 y posterior subclonaje	<i>E. coli</i> DH5α	P-ADCK2
pGEX-ADCK2-GST	pGEX-4T-1 (Amersham)	Para la sobreexpresión y purificación de ADCK2 sin la región MTS. Dispone del <i>tag</i> de GST.	<i>E. coli</i> BL21	ADCK2_Externo
pYES-ADCK2-V5-His6X (Fase)	pYES 2.1 (Invitrogen)	ADCK2 en vector de levadura con los <i>tag</i> de V5 e His6X para su posterior clonaje en pcDNA	Levadura	ADCK2_Fase
pcDNA-ADCK2-V5-His6X	pcDNA 3.1 Myc-His (Invitrogen)	Para sobreexpresión transitoria del ADCK2	Línea celular	pcDNA
pEGFP-ADCK2-EGFP	pEGFP-N1 (Clontech)	Para sobreexpresión transitoria y localización de ADCK2 con EGFP como <i>tag</i>	Línea celular	ADCK2_GFP
pRRL-ADCK2-GFP	pRRL.sin.EF1α-PGK-GFP	Para la sobreexpresión estable de ADCK2 mediante el uso de partículas lentivíricas	Línea celular	P-ADCK2
pGEMT-P.YPL109c..T	PGEM-T Easy (Invitrogen)	Para el almacenamiento de la secuencia de YPL109c junto a su promotor y terminador.	Levadura	YPL109cBDcol
pYES-ADCK2.T	pYES 2.1 (Invitrogen)	Para el almacenamiento de la secuencia de ADCK2 junto con el terminador de YPL109c	Levadura	P-ADCK2(F) ADCK2recbTER (R) 109recbTER (F) YPL109cBDcol (R)
pYES-P.MTS.ADCK2.T	pYES 2.1 (Invitrogen)	Para almacenamiento de la secuencia de ADCK2 junto con el promotor, MTS y terminador de YPL109c	Levadura	YPL109cBDcol(F) 109recbPRO (R) ADCK2RecbPRO(F) YPL109cBDcol (R)
pRS426-YPL109c	pRS426	Para obtener la secuencia de YPL109c con su promotor, terminador y MTS. Multicopia	Levadura	109colPRS
pRS426-ADCK2	pRS426	Para obtener la secuencia de ADCK2 con el promotor, terminador y MTS de YPL109c.. Multicopia	Levadura	109colPRS
pRS426-YPL109cStop	pRS426	Para obtener la secuencia de YPL109c con la mutación análoga a ADCK2-P1 y P2. Multicopia	Levadura	MutE MutW2
pRS426-ADCK2Stop	pRS426	Para obtener la secuencia de ADCK2 con la mutación de ADCK2-P1 y P2. Multicopia	Levadura	ADCK2Mut_RL
pRS426-YPL109cPun	pRS426	Para obtener la secuencia de YPL109c con la mutación análoga a ADCK2-P3. Multicopia	Levadura	MutaYPL829
pRS426-ADCK2Pun	pRS426	Para obtener la secuencia de ADCK2 con la mutación de ADCK2-P3. Multicopia	Levadura	MutaADCK2829

Tabla 10. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Anticuerpo 2º	Organismo diana	Tamaño observado	Concentración	Casa comercial
Anti-ADCK2	Anti-conejo	<i>Homo sapiens</i>	50kDa	1:1000	Biomedal
Anti-ADCK2	Anti-conejo	<i>Mus musculus</i> <i>Homo sapiens</i>	50kDa	1:500	Biorbyt
Anti-GST	Anti-ratón	Transformado con pGEX	25KDa	1:1000	Sigma
Anti-Calnexina	Anti-conejo	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	75kDa	1:1500	Stressgen
Anti-LDH	Anti-cabra	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	35kDa	1:2000	Rockland
Anti-Tom20	Anti-conejo	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	15kDa	1:10000 1:50	Santa cruz
Anti-Mitofusina2	Anti-conejo	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	75kDa	1:1000	Abcam
Anti-Opa1	Anti-ratón	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	92kDa	1:1000	BD Biosciences
Anti-OAT	Anti-ratón	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	45kDa	1:1000	Acris antibodies
Anti-LC3	Anti-ratón	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	LC3-II 14kDa LC3-I 16kDa	1:1000	Cell Signaling

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Agatep, R., & Kirkpatrick, R. D. (1999). "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol." *Retrieved 2001*.
- Alexander Fraser, J., Biousse, V., & Newman, N. (2010). The Neuro-Ophthalmology of Mitochondrial Disease. *Surv Ophthalmol*, 55(2010), 299–334. doi:10.1016/j.survophthal.2009.10.002.The
- Arroyo, A., & F. Navarro. (2000). Interactions between ascorbyl free radical and coenzyme Q at the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 32(2), 199–210.
- Arroyo, B. A., Villalba, J. M. J. M., Arroyo, A., Rodríguez-Aguilera, J. C., Santos-Ocaña, C., & Navas, P. (2004). Stabilization of extracellular ascorbate mediated by coenzyme Q transmembrane electron transport. *Methods in Enzymology*, 378(1994), 207–217.
- Auré, K., Benoist, J. F., Ogier de Baulny, H., Romero, N. B., Rigal, O., & Lombès, A. (2004). Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology*, 63(4), 727–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326254>
- Barkovich, R. J., Shtanko, A., Shepherd, J. A., Lee, P. T., Myles, D. C., Tzagoloff, A., & Clarke, C. F. (1997). Characterization of the COQ5 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a C-methyltransferase in ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 272(14), 9182–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9083049>
- Barros, M. H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Clarke, C. F., & Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *The Journal of biological chemistry*, 280(52), 42627–35. doi:10.1074/jbc.M510768200
- Bartoschek, S., Johansson, M., Geierstanger, B. H., Okun, J. G., Lancaster, C. R., Humpfer, E., Yu, L., et al. (2001). Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome bc1 complex. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), 35231–4. doi:10.1074/jbc.C100365200
- Beal, M. F. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36(4), 381–6. doi:10.1023/B:JOBB.0000041772.74810.92
- Belogradov, G. I., Lee, P. T., Jonassen, T., Hsu, A. Y., Gin, P., & Clarke, C. F. (2001). Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis.

- Archives of biochemistry and biophysics*, 392(1), 48–58.
doi:10.1006/abbi.2001.2448
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010). Coenzyme Q: biosynthesis and functions. *Biochemical and biophysical*, 396(1), 74–9.
doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
- Bernsen, P. L., Gabreëls, F. J., Ruitenbeek, W., & Hamburger, H. L. (1993). Treatment of complex I deficiency with riboflavin. *Journal of the neurological sciences*, 118(2), 181–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229067>
- Beyer, R. E., Burnett, B. A., Cartwright, K. J., Edington, D. W., Falzon, M. J., Kreitman, K. R., Kuhn, T. W., et al. (1985). Tissue coenzyme Q (ubiquinone) and protein concentrations over the life span of the laboratory rat. *Mechanisms of ageing and development*, 32(2-3), 267–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4087945>
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., & Alessi, D. R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology*, 16(9), 443–52.
doi:10.1016/j.tcb.2006.07.003
- Bousquet, I., Dujardin, G., & Slonimski, P. P. (1991). translation defect and is essential for the electron transfer in the bc1 complex, 10(8), 2023–2031.
- Bowers, M., & Ardehali, H. (2006). TOM20 and the heartbreakers: evidence for the role of mitochondrial transport proteins in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(3), 406–9. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.06.073
- Bradford, M. (1976). “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem*, 72, 248–254.
- Brasseur, G., Tron, G., Dujardin, G., Slonimski, P. P., & Brivet-Chevillotte, P. (1997). The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bc1 complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *European journal of biochemistry*, 246(1), 103–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210471>
- Bryan Dixon, J. (2009). Gastrocnemius vs. soleus strain: how to differentiate and deal with calf muscle injuries. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 2(2), 74–7.
doi:10.1007/s12178-009-9045-8
- Campbell, I., & Duffus, J. H. (1988). Yeast, a practical approach. *Oxford, Oxford University Press*.
- Casarin, A., Jimenez-Ortega, J. C., Trevisson, E., Pertegato, V., Doimo, M., Ferrero-Gomez, M. L., Abbadi, S., et al. (2008). Functional characterization of human COQ4, a gene required for Coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochemical and*

- Chinnery, P, Majamaa, K., Turnbull, D., & D, T. (2006). Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev*, 25(1), CD004426.
- Chinnery, PF. (2002). Inheritance of mitochondrial disorders. *Mitochondrion*, 2, 149–55.
- Clark, J., Hayes, D., Morgan-Hughes, J., & Byrne, E. (1984). Mitochondrial myopathies: disorders of the respiratory chain and oxidative phosphorylation. *J. Inherited Metab. Dis.*, 7(1), 62–68.
- Clarke, C. F., Williams, W., & Teruya, J. H. (1991). Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. *The Journal of biological chemistry*, 266(25), 16636–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1885593>
- Council of Europe. (2006). *Appendix A of the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS n^o. 123)* (pp. 1–109).
- Crane, F. L., Hatefi, Y., Lester, R. L., & Widmer, C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 220–221.
- Cui, T.-Z., & Kawamukai, M. (2009). Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *The FEBS journal*, 276(3), 748–59. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06821.x
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, 28, 435–92. doi:10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
- Diomed-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F. M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G. M., et al. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *Journal of the American Society of Nephrology*: JASN, 18(10), 2773–80. doi:10.1681/ASN.2006080833
- Do, T. Q., Hsu, a Y., Jonassen, T., Lee, P. T., & Clarke, C. F. (2001). A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *The Journal of biological chemistry*, 276(21), 18161–8. doi:10.1074/jbc.M100952200
- Do, T. Q., Schultz, J. R., & Clarke, C. F. (1996). Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7534–9. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Duarte, A., Poderoso, C., Cooke, M., Soria, G., Cornejo Maciel, F., Gottifredi, V., & Podestá, E. J. (2012). Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PloS one*, 7(9), e45829. doi:10.1371/journal.pone.0045829
- Duncan, A. J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I. P., López, L. C., Hirano, M., et al. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *American journal of human genetics*, 84(5), 558–66. doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.018
- Dutta, A., Vats, P., Singh, V. K., Sharma, Y. K., Singh, S. N., & Singh, S. B. (2009). Impairment of mitochondrial beta-oxidation in rats under cold-hypoxic environment. *International journal of biometeorology*, 53(5), 397–407. doi:10.1007/s00484-009-0224-5
- Echtay, K. S., Winkler, E., & Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, 408, 609–613.
- Emmanuele, V., López, L. C., Berardo, A., Naini, A., Tadesse, S., Wen, B., D'Agostino, E., et al. (2012). Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Archives of neurology*, 69(8), 978–83. doi:10.1001/archneurol.2012.206
- Fernandez-Ayala, D. J., Brea-Calvo, G., Lopez-Lluch, G., & Navas, P. (2005). Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochim Biophys Acta*, 1713(2), 129–137. doi:S0005-2736(05)00162-8 [pii] 10.1016/j.bbamem.2005.05.010
- Festenstein, G. N., Heaton, F. W., Lowe, J. S., & Morton, R. A. (1955). A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (Emax 272 mA.). *Biochem. J.*, 59, 558–566.
- Fontaine, E., Ichas, F., & Bernardi, P. (1998). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem*, 273, 25734–25740.
- Forsgren, M., Attersand, A., Lake, S., Grünler, J., Swiezewska, E., Dallner, G., & Climent, I. (2004). Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *The Biochemical journal*, 382(2), 519–26. doi:10.1042/BJ20040261
- Frazier, A., & Thorburn, D. (2012). Biochemical Analyses of the Electron Transport Chain by Spectrophotometry. *Mitochondrial Disorders: Biochemical and Molecular Analysis* (pp. 49–62).

- Frei. (1999). Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *Faseb J.*, 963–972.
- Frei, B., & Kim, M. C. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *PNAS*, 87(12), 4879–4883.
- Frerman, F. E. (1988). Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase. *Biochem Soc Trans*, 16(3), 416–418.
- Frezza, C., Cipolat, S., & Scorrano, L. (2007). “Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts”. *Nature protocols*, 2, 287–295.
- Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B., Hans, H., Pa, B., et al. (2007). The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring- flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain*, 130, 2037–2044. doi:10.1093/brain/awm054
- Gerards, M., Bosch, B. J. C. Van Den, Danhauser, K., Weeghel, M. Van, Wanders, R. J. A., Nicolaes, G. A. F., & Sluiter, W. (2011). Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene. *Brain*, 134, 210–219. doi:10.1093/brain/awq273
- Glick, B., & Pon, L. (1995). “Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*”. *Methods In Enzymology*, 260, 213–223.
- Goewert, R. (1980). *Studies on the Biosynthesis of Ubiquinone* (p. St. Louis, MO: Saint Louis University).
- González-Mariscal, I. (2011). *La fosfatasa mitocondrial PPTC7, punto de encuentro entre el metabolismo bioenergético y la mitofagia*.
- Gordon, P. A., & Stewart, P. R. (1969). Ubiquinone formation in wild-type and petite yeast: the effect of catabolite repression. *Biochimica et biophysica acta*, 177(2), 358–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5780097>
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309–1312.
- Guan, Z., Söderberg, M., Sindelar, P., Prusiner, S. B., Kristensson, K., & Dallner, G. (1996). Lipid composition in scrapie-infected mouse brain: prion infection increases the levels of dolichyl phosphate and ubiquinone. *Journal of neurochemistry*, 66(1), 277–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8522965>
- Guthrie, C., & Fink, G. R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *San Diego, Academic Press*.

- Gómez-Díaz, C., Rodríguez-Aguilera, J. C., Barroso, M. P., Villalba, J. M., Navarro, F., Crane, F. L., & Navas, P. (1997). Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q10 reductase in the plasma membrane. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29(3), 251–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298710>
- Hagerman, R. A., Trotter, P. J., & Willis, R. A. (2002). The regulation of COQ5 gene expression by energy source. *Free radical research*, 36(4), 485–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069115>
- Hamilton, S. J., Chew, G. T., & Watts, G. F. (2007). Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & vascular disease research*, 4(2), 89–102. doi:10.3132/dvdr.2007.026
- Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., Xie, L. X., et al. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 2013–2024. doi:10.1172/JCI45693DS1
- Hildebrandt, T. M., & Grieshaber, M. K. (2008). Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J*, 275(13), 3352–3361.
- Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J., & Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal \hat{I}^2 -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), 35–64. doi:10.1016/S0168-6445(03)00017-2
- Horvath, R., Czermin, B., Gulati, S., Demuth, S., Houge, G., Pyle, A., Dineiger, C., et al. (2012). Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in CABC1/ADCK3. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 83(2), 174–8. doi:10.1136/jnnp-2011-301258
- Horvath, R., Schneiderat, P., Schoser, B. G. H., Gempel, K., Neuen-Jacob, E., Ploger, H., & Muller-Hocker, J. (2006). Coenzyme Q10 deficiency may cause isolated myopathy. *Neurology*, 66, 253–255.
- Horvath, Rita. (2012). Update on clinical aspects and treatment of selected vitamin-responsive disorders II (riboflavin and CoQ 10). *Journal of inherited metabolic disease*, 35(4), 679–87. doi:10.1007/s10545-011-9434-1
- Hsu, A. Y., Do, T. Q., Lee, P. T., & Clarke, C. F. (2000). Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1484(2-3), 287–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760477>
- Jackson, S. (2013). Comunicación personal.

- Jeong, D., Cho, I. T., Kim, T. S., Bae, G. W., Kim, I.-H., & Kim, I. Y. (2006). Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism. *Molecular and cellular biochemistry*, 284(1-2), 1–8. doi:10.1007/s11010-005-9004-7
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N. B. N., Hsieh, E. J. E. J., Wu, M., Barros, M. H. M. H. M. H., Clarke, C. F. C. F. C. F., et al. (2005a). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31397–31404. doi:10.1074/jbc.M503277200
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Hsieh, E. J., Wu, M., Barros, M. H., Clarke, C. F., et al. (2005b). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 280(36), 31397–404. doi:10.1074/jbc.M503277200
- Jonassen, T., & Clarke, C. F. (2000). Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 275(17), 12381–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777520>
- Jonassen, T., Proft, M., Randez-Gil, F., Schultz, J. R., Marbois, B. N., Entian, K. D., & Clarke, C. F. (1998). Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 273(6), 3351–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452453>
- Jones, M. E. (1980). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 49, 253–279.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science*, 117(Pt 13), 2805–12. doi:10.1242/jcs.01131
- Kalén, A., Appelkvist, E. L., & Dallner, G. (1989). Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids*, 24(7), 579–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2779364>
- Keogh, M. J., & Chinnery, P. F. (2013). How to spot mitochondrial disease in adults. *Clinical medicine*, 13(1), 87–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472503>
- Koga, Y., Akita, Y., Nishioka, J., & Al., E. (2005). L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology*, 64, 710–12.
- Kojovic, M., Pareés, I., Lampreia, T., Pienczk-Reclawowicz, K., Xiomerisiou, G., Rubio-Agusti, I., Kramberger, M., et al. (2013). The syndrome of deafness-dystonia: Clinical and genetic heterogeneity. *Movement disorders*, 10, 1002. doi:10.1002/mds.25394

- Krzymień, J., & Karnafel, W. (2013). Lactic acidosis in patients with diabetes. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299861>
- Lalani, S. R., Vladutiu, G. D., Plunkett, K., Lotze, T. E., Adesina, A. M., & Scaglia, F. (2005). Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Archives of neurology*, 62(2), 317–20. doi:10.1001/archneur.62.2.317
- Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D. C., Bertini, E., Servidei, S., Valeriani, M., et al. (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, 60(7), 1206–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682339>
- Law, L.-K., Tang, N. L. S., Hui, J., Fung, S. L. M., Ruiters, J., Wanders, R. J. a, Fok, T.-F., et al. (2009). Novel mutations in ETFDH gene in Chinese patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clinica chimica acta*, 404(2), 95–9. doi:10.1016/j.cca.2009.02.015
- Leonard, C. J., Aravind, L., & Koonin, E. V. (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome research*, 8(10), 1038–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9799791>
- Lerer, I., Sagi, M., Malamud, E., Levi, H., Raas-Rothschild, A., & Abeliovich, D. (2000). Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *American journal of medical genetics*, 95(1), 53–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074495>
- Liang, W.-C., Ohkuma, A., Hayashi, Y. K., López, L. C., Hirano, M., Nonaka, I., Noguchi, S., et al. (2009). ETFDH mutations, CoQ10 levels, and respiratory chain activities in patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuromuscular disorders*, 19(3), 212–6. doi:10.1016/j.nmd.2009.01.008
- Lockshon, D., Surface, L. E., Kerr, E. O., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. K. (2007). The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics*, 175(1), 77–91. doi:10.1534/genetics.106.064428
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 15(7), 1957–97. doi:10.1089/ars.2010.3586
- Lämmer, a B., Rolinski, B., Ahting, U., & Heuss, D. (2011). Multiple acyl-CoA-dehydrogenase deficiency (MADD)--a novel mutation of electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase ETFDH. *Journal of the neurological sciences*, 307(1-2), 166–7. doi:10.1016/j.jns.2011.05.001

- López, L., Schuelke, M., Quinzii, C. M., Kanki, T., Rodenburg, R. J. T., Naini, A., Dimauro, S., et al. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *American journal of human genetics*, 79(6), 1125–9. doi:10.1086/510023
- López-Martín, J. M., Salviati, L., Trevisson, E., Montini, G., DiMauro, S., Quinzii, C., Hirano, M., et al. (2007). Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Human molecular genetics*, 16(9), 1091–7. doi:10.1093/hmg/ddm058
- Löw, P., Andersson, M., Edlund, C., & Dallner, G. (1992). Effects of mevinolin treatment on tissue dolichol and ubiquinone levels in the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 1165(1), 102–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1420339>
- Macinga, D. R., Cook, G. M., Poole, R. K., & Rather, P. N. (1998). Identification and characterization of *aarF*, a locus required for production of ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli* and for expression of 2'-N-acetyltransferase in *P. stuartii*. *Journal of bacteriology*, 180(1), 128–35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106858&tool=pmcncetrez&rendertype=abstract>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912–34. doi:10.1126/science.1075762
- Marbois, B., Gin, P., Faull, K. F., Poon, W. W., Lee, P. T., Strahan, J., Shepherd, J. N., et al. (2005). Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *The Journal of biological chemistry*, 280(21), 20231–8. doi:10.1074/jbc.M501315200
- Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., & Clarke, C. F. (2009). The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(1), 69–75. doi:10.1016/j.bbalip.2008.10.006
- Marbois, B. N., & Clarke, C. F. (1996). The COQ7 gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 271(6), 2995–3004. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621692>
- Mariño, G., & López-Otín, C. (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, 61(12), 1439–54. doi:10.1007/s00018-004-4012-4
- Martin-Montalvo, A. (2009). *Caracterización de la función de la proteína Coq7 de Saccharomyces cerevisiae en la regulación de la síntesis de coenzima Q.*

- McFarland, R., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet neurology*, 9(8), 829–40. doi:10.1016/S1474-4422(10)70116-2
- Mehl, A. L., & Thomson, V. (2002). The Colorado newborn hearing screening project, 1992-1999: on the threshold of effective population-based universal newborn hearing screening. *Pediatrics*, 109(1), E7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773575>
- Mitchell, P. (1975). Protonmotive redox mechanisms of cytochrome b-cl complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycl. *FEBS Lett.*, 56, 1–6.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861–73. doi:10.1101/gad.1599207
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function*, 27(6), 421–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576635>
- Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., et al. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 765–72. doi:10.1172/JCI29089
- Montero, R., Sánchez-Alcázar, J. A., Briones, P., Hernández, A. R., Cordero, M. D., Trevisson, E., Salviati, L., et al. (2008). Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clinical biochemistry*, 41(9), 697–700. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.03.007
- Moreno-Garcia, M. a, Rosenblatt, D. S., & Jerome-Majewska, L. a. (2012). The methylmalonic aciduria related genes, Mmaa, Mmab, and Mut, are broadly expressed in placental and embryonic tissues during mouse organogenesis. *Molecular genetics and metabolism*, 107(3), 368–74. doi:10.1016/j.ymgme.2012.09.009
- Morton, R. (1961). Isolation and characterization of ubiquinone (Coenzyme Q) and ubichromanol. In: *Wolstenholm, G.E.W., O'Connor, C.M. (Eds.), Ciba Symposium on Quinones in Electron Transport. J.A. Churchill, London*, 2–258.
- Musumeci, O., Naini, A., Slonim, A. E., Skavin, N., Hadjigeorgiou, G. L., Krawiecki, N., Weissman, B. M., et al. (2001). Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, 56(7), 849–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294920>
- Mörck, C., Olsen, L., Kurth, C., Persson, A., Storm, N. J., Svensson, E., Jansson, J.-O., et al. (2009). Statins inhibit protein lipidation and induce the unfolded protein

- response in the non-sterol producing nematode *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, 106(43), 18285–90. doi:10.1073/pnas.0907117106
- Nagy, M., & Lacroute, F. (1992). Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts. *PNAS*, 89(19), 8966– 8970.
- Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asaumi, S., Isono, K., Takao, T., et al. (2001). Mouse homologue of coq7/clk-1, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(2), 463–71. doi:10.1006/bbrc.2001.5977
- Nance, W. E. (2003). The genetics of deafness. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 9(2), 109–19. doi:10.1002/mrdd.10067
- Noorda, G., Achterberg, T. Van, Van der Hooft, T., Smeitink, J., Schoonhoven, L., & Van Engelen, B. (2012). Problems of Adults with a Mitochondrial Disease – The Patients’ Perspective: Focus on Loss. *JIMD Rep.*, 6, 85–94. doi:10.1007/8904
- Ogasahara, S., Engel, A. G., Frens, D., & Mack, D. (1989). Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2379–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=286916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ohkuma, A., Noguchi, S., Sugie, H., Malicdan, M. C. V, Fukuda, T., Shimazu, K., López, L. C., et al. (2009). Clinical and genetic analysis of lipid storage myopathies. *Muscle & nerve*, 39(3), 333–42. doi:10.1002/mus.21167
- Olsen, R. K. J., Andresen, B. S., Christensen, E., Bross, P., Skovby, F., & Gregersen, N. (2003). Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Human mutation*, 22(1), 12–23. doi:10.1002/humu.10226
- Olsen, R. K. J., Olpin, S. E., Andresen, B. S., Miedzybrodzka, Z. H., Pourfarzam, M., Frerman, F. E., Beresford, M. W., et al. (2007). ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain*, 130, 2045–2054. doi:10.1093/brain/awm135
- Olson, R. E., & Rudney, H. (1983). Biosynthesis of ubiquinone. *Vitamins and Hormones*, 40, 1–43.
- Padilla, S, Tran, U. C., Jiménez-Hidalgo, M., López-Martín, J. M., Martín-Montalvo, a, Clarke, C. F., Navas, P., et al. (2009). Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, 66(1), 173–86. doi:10.1007/s00018-008-8547-7

- Padilla, Sergio, Jonassen, T., Jiménez-Hidalgo, M. a, Fernández-Ayala, D. J. M., López-Lluch, G., Marbois, B., Navas, P., et al. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *JBC*, 279(25), 25995–6004. doi:10.1074/jbc.M400001200
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR". *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Philippsen, P., & Stotz, A. (1991). "DNA of *Saccharomyces cerevisiae*". *Methods Enzymol*, 194, 169–182.
- Poon, W. W., Do, T. Q., Marbois, B. N., & Clarke, C. F. (1997). Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants. *Molecular aspects of medicine*, 18 Suppl, S121–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9266513>
- Poon, W. W., Marbois, B. N., Faull, K. F., & Clarke, C. F. (1995). 3-Hexaprenyl-4-hydroxybenzoic acid forms a predominant intermediate pool in ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *biochemistry and biophysics*, 320(2), 305–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7625838>
- Quinzii, C, & Hirano, M. (2012). Primary and secondary CoQ10 deficiencies in humans. *Biofactors*, 37(5), 361–365. doi:10.1002/biof.155.Primary
- Quinzii, C M, Kattah, A. G., Naini, A., Akman, H. O., Mootha, V. K., DiMauro, S., & Hirano, M. (2005). Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology*, 64(3), 539–41. doi:10.1212/01.WNL.0000150588.75281.58
- Quinzii, Catarina M, Assoum, M., Lagier-tourenne, C., Tazir, M., Lo, L. C., Drouot, N., Busso, C., et al. (2008). ADCK3 , an Ancestral Kinase , Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q 10 Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, (82), 661–672. doi:10.1016/j.ajhg.2007.12.024.
- Quinzii, Catarina M, & Hirano, M. (2010). Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Developmental disabilities research reviews*, 16(2), 183–8. doi:10.1002/ddrr.108
- Quinzii, Catarina, Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., & Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *American journal of human genetics*, 78(2), 345–9. doi:10.1086/500092
- Rahman, S. (2012). Mitochondrial disease and epilepsy. *Developmental medicine and child neurology*, 54(5), 397–406. doi:10.1111/j.1469-8749.2011.04214.x

- Reichmann, H., Vogler, L., & Seibel, P. (1996). Ragged red or ragged blue fibers. *European neurology*, 36(2), 98–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654494>
- Rizzuto, R., Marchi, S., Zecchini, E., & Pinton, P. (2010). Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11), 1342–1351. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.03.015.Ca
- Rodríguez-hernández, M. Á., Cordero, M. D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., & Briones, P. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy*, 5(1), 19–32.
- Rötig, A., Appelkvist, E. L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhon, N., Edery, P., Leideau, M., et al. (2000). Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet*, 356(9227), 391–5. doi:10.1016/S0140-6736(00)02531-9
- Salvadori, M. L. B., Lessa, T. B., Russo, F. B., Fernandes, R. A., Kfoury, J. R., Braga, P. C. B. B., & Miglino, M. A. (2012). Mice embryology: a microscopic overview. *Microscopy research and technique*, 75(10), 1437–44. doi:10.1002/jemt.22087
- Salviati, L., Trevisson, E., Rodriguez Hernandez, M. A., Casarin, A., Pertegato, V., Doimo, M., Cassina, M., et al. (2012). Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *Journal of medical genetics*, 49(3), 187–91. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100394
- Santos-Ocana, C., Do, T. Q., Padilla, S., Navas, P., & Clarke, C. F. (2002). “Uptake of Exogenous Coenzyme Q and Transport to Mitochondria Is Required for bc1 Complex Stability in Yeast coq Mutants”. *J. Biol. Chem.*, 277, 10973–10981.
- Scheeff, E. D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S., & Gerard, M. (2009). Structure of the Pseudokinase VRK3 Reveals a Degraded Catalytic Site, a Highly Conserved Kinase Fold, and a Putative Regulatory Binding Site. *Structure*, 17(1), 128–138.
- Schmelzer, C., Lindner, I., Vock, C., Fujii, K., & Döring, F. (2007). Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study. *IUBMB*, 59(10), 628–633. doi:10.1080/15216540701545991
- Scholte, H. R., Busch, H. F., Bakker, H. D., Bogaard, J. M., Luyt-Houwen, I. E., & Kuyt, L. P. (1995). Riboflavin-responsive complex I deficiency. *Biochimica et biophysica acta*, 1271(1), 75–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7599230>
- Schoolmeesters, A., Brown, D. D., & Fedorov, Y. (2012). Kinome-wide functional genomics screen reveals a novel mechanism of TNF α -induced nuclear accumulation of the HIF-1 α transcription factor in cancer cells. *PloS one*, 7(2), e31270. doi:10.1371/journal.pone.0031270

- Serrano, R. (1988). "H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution." *Methods Enzymol*, 157, 133–544.
- Shepard, T. H., Muffley, L. A., & Smith, L. T. (1998). Ultrastructural study of mitochondria and their cristae in embryonic rats and primate (*N. nemistrina*). *The Anatomical record*, 252(3), 383–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811216>
- Shepard, T. H., Muffley, L. A., & Smith, L. T. (2000). Mitochondrial ultrastructure in embryos after implantation. *Human reproduction*, 15, 218–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041527>
- Shults, C. W. (2005). Therapeutic role of coenzyme Q(10) in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics*, 107(1), 120–30. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.02.002
- Simmen, T., Lynes, E. M., Gesson, K., & Thomas, G. (2010). Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et biophysica acta*, 1798(8), 1465–73. doi:10.1016/j.bbamem.2010.04.009
- Singh, H., Usher, S., Johnson, D., & Poulos, a. (1990). A comparative study of straight chain and branched chain fatty acid oxidation in skin fibroblasts from patients with peroxisomal disorders. *Journal of lipid research*, 31(2), 217–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691260>
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., & Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature protocols*, 7(6), 1235–46. doi:10.1038/nprot.2012.058
- Theiin, A., Schedin, S., & Dallner, G. (1992). Half-life of ubiquinone-9 in rat tissues. *FEBS Letters*, 313(2), 118–120.
- Thomas, S. R., Neuzil, J., & Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(5), 687–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8963727>
- Tran, U. C., & Clarke, C. F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion*, 7, 62–71. doi:10.1016/j.mito.2007.03.007
- Tran, U. C., Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., Jonassen, T., & Clarke, C. F. (2006). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 281(24), 16401–9. doi:10.1074/jbc.M513267200

- Turunen, M., Olsson, J., & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1660(1-2), 171–199. doi:10.1016/j.bbamem.2003.11.012
- Turunen, M., Wehlin, L., Sjöberg, M., Lundahl, J., Dallner, G., Brismar, K., & Sindelar, P. J. (2002). beta2-Integrin and lipid modifications indicate a non-antioxidant mechanism for the anti-atherogenic effect of dietary coenzyme Q10. *Biochemical and biophysical*, 296(2), 255–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163010>
- Ubersax, J. A., & Ferrell, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), 530–41. doi:10.1038/nrm2203
- Vajo, Z., King, L. M., Jonassen, T., Wilkin, D. J., Ho, N., Munnich, A., Clarke, C. F., et al. (1999). Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 10(10), 1000–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501970>
- Van Maldergem, L., Trijbels, F., DiMauro, S., Sindelar, P. J., Musumeci, O., Janssen, A., Delberghe, X., et al. (2002). Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Annals of neurology*, 52(6), 750–4. doi:10.1002/ana.10371
- Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F., & Vanoevelen, J. (2011). The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5), online. doi:10.1101/cshperspect.a004184
- Ventura, G., Moinard, C., Segaud, F., Le Plenier, S., Cynober, L., & De Bandt, J. P. (2010). Adaptive response of nitrogen metabolism in early endotoxemia: role of ornithine aminotransferase. *Amino acids*, 39(5), 1417–26. doi:10.1007/s00726-010-0601-8
- Vockley, J. (2008). Metabolism as a complex genetic trait, a systems biology approach: implications for inborn errors of metabolism and clinical diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 31(5), 619–29. doi:10.1007/s10545-008-1005-8
- Wang, Y., Mohsen, A.-W., Mihalik, S. J., Goetzman, E. S., & Vockley, J. (2010). Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *The Journal of biological chemistry*, 285(39), 29834–41. doi:10.1074/jbc.M110.139493
- Watmough, N. J., Bindoff, L. A., Birch-machin, M. A., Jackson, S., Bartlett, K., Ragan, C. I., Poulton, J., et al. (1990). Impaired Mitochondrial α -Oxidation in a Patient with an Abnormality of the Respiratory Chain Studies in Skeletal Muscle Mitochondria Case history. *J. Clin. Invest.*, 85(1), 177–184.

- Xie, L. X., Hsieh, E. J., Watanabe, S., Allan, C. M., Chen, J. Y., Tran, U. C., & Clarke, C. F. (2011). Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. *Biochimica et biophysica acta*, 1811(5), 348–60. doi:10.1016/j.bbailip.2011.01.009
- Xie, L. X., Ozeir, M., Tang, J. Y., Chen, J. Y., Jaquinod, S.-K., Fontecave, M., Clarke, C. F., et al. (2012). Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *The Journal of biological chemistry*, 287(28), 23571–81. doi:10.1074/jbc.M112.360354
- Zeqiraj, E., Filippi, B. M., Deak, M., Alessi, D. R., & Aalten, D. M. F. Van. (2009). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation. *SCIENCE*, 326, 1707–1711.
- Zeqiraj, E., & Van Aalten, D. M. F. (2010). Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators? *Current opinion in structural biology*, 20(6), 772–81. doi:10.1016/j.sbi.2010.10.001
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastián, D., Segalés, J., & Palacín, M. (2010). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(6), 566–74. doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.002